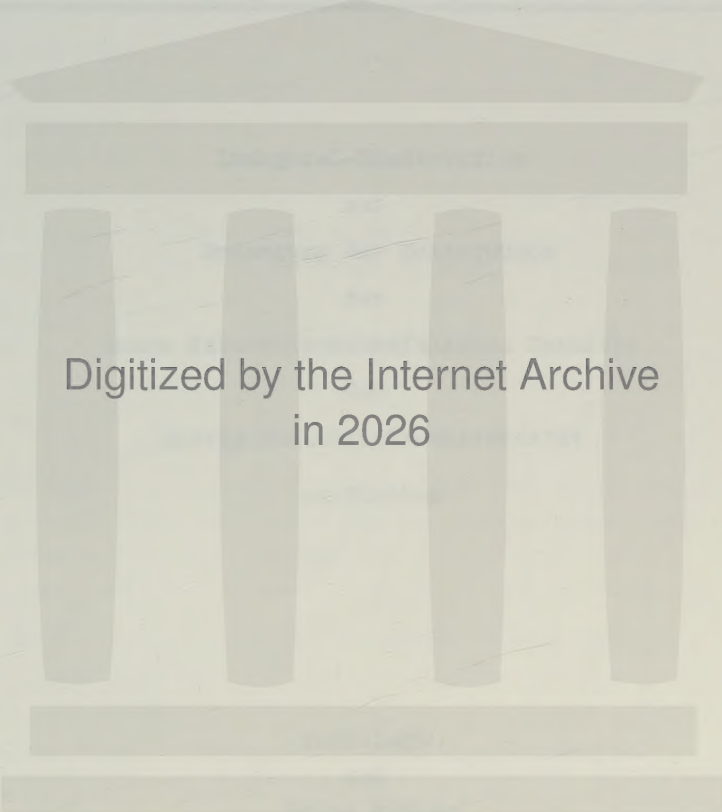


**Zur Strukturaufklärung eines neuen
Flavonolglykosids aus Solanum tuberosum L.
und über neue Methoden der
chromatographischen Adsorptionsanalyse
an Kunststefpulvern**

Heinz Rösler

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zur Strukturaufklärung eines neuen Flavonolglykosids
aus Solanum tuberosum L. und über neue Methoden der chro-
matographischen Adsorptionsanalyse an Kunststoffpulvern

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Heinz Rösler
aus
München
Januar 1960



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1960

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Allgemeiner Teil

A. Isolierungen und Strukturaufklärungen von Flavonolglykosiden aus den Blättern von <i>Solanum tuberosum</i> L.	1
I. Einleitung	1
II. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanze	2
III. Prüfung von 25 Kartoffelsorten auf Flavonglykoside	3
IV. Glykosidisolierungen aus den Blättern von <i>Solanum tuberosum</i> , Handelssorte Carmen	5
V. Identifizierung der unter IV isolierten Substanzen	8
1. Glykosid A	9
2. Glykosid C	9
3. Identifizierung von Glykosid B	10
a) Papierchromatographische Untersuchung des Disaccharids aus Glykosid B	11
b) Papierelektrophoretische Untersuchung des Disaccharids aus Glykosid B	12
VI. Synthese von Quercetindiglukosiden	16
VII. Vergleich von Glykosid B mit den Syntheseprodukten	22
VIII. Vergleich von Meratin und Glykosid B	27
IX. Zusammenfassung	28
B. Neue Methoden der chromatographischen Adsorptionsanalyse an Kunststoffpulvern	30
I. Problemstellung	30
II. Dünnschichtchromatographie von Pflanzeninhaltsstoffen auf Kunststoffbelägen	31
1. Trennungen auf Ultramid BMK	32
2. Trennungen auf Durethan BK 31 F	33
3. Bereitung des Kunststoffpulvers	34
4. Wahl des Lösungsmittels für die Entwicklung von Dünnschichtchromatogrammen	36
5. Konservierung von Dünnschichtchromatogrammen ..	37
III. Dünnschichtchromatographie von Zuckern auf Kieselgel G	37
IV. Ein neues Trennverfahren auf Ultramid- bzw. Durethansäulen in aufsteigender Arbeitsweise	38

Experimenteller Teil

Methodische Einzelheiten zu Teil A	40
I. Papierchromatographie	40
II. Prüfung von 25 Kartoffelsorten auf flavonische Bestandteile	42
III. Isolierung der natürlichen Glykoside aus den Blättern von <i>Solanum tuberosum</i> , var. Carmen	42
1. Verteilungschromatographische Auftrennung zweier Glykoside auf einer Zellulosesäule	43
2. Gewinnung einer papierchromatographisch reinen Lösung eines Quercetintri- oder -tetrasaccharids auf einer Ultramidsäule	45
IV. Zur Synthese der Quercetindisaccharide	46
V. Gewinnung von Gentiobiose, ausgehend von Glukose auf reversionssynthetischem Wege	49
VI. Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Flavonolglykoside	51
VII. Hydrolysen	54
VIII. Identifizierung der Aglykone	55
IX. Identifizierung der Zuckerkomponenten	56
X. Klärung der glykosidischen Bindungsform	59
Methodische Einzelheiten zu Teil B	60
I. Fällung des Durethans BK 31 F	60
II. Dünnschichtchromatographie auf Durethan	61
III. Konservierung von Dünnschichtchromatogrammen	63
IV. Umfällung von Ultramid BMK zum Zweck der Bereitung eines monomerenarmen Pulvers	64
V. Dünnschichtchromatographie von Zuckern auf Silicagel	65
VI. Aufsteigende Chromatographie an Polyamidsäulen ...	66

Allgemeiner Teil

A. Isolierungen und Strukturaufklärung von Flavonolglykosiden aus den Blättern von Solanum tuberosum L.

I. Einleitung

Die Kartoffelpflanze, die wegen ihrer volkswirtschaftlichen Bedeutung seit jeher die Naturforscher interessierte, war schon oft Gegenstand phytochemischer Bearbeitung.

In jüngster Zeit beschäftigte sich eine Gruppe von finnischen Biochemikern um A. I. VIRTANEN¹⁾ mit den Inhaltsstoffen der Kartoffelblätter. Sie untersuchten diese auf das Vorhandensein von Verbindungen, die als Resistenzfaktoren gegenüber Pilzschädlingen und gegen Insektenfraß in Frage kommen könnten. So wird z. B. der Chlorogensäure, einem Depsid aus Kaffeesäure und Chinasäure, Wirksamkeit gegenüber Phytophthora infestans zugeschrieben.

R. KUHN und I. LÖW²⁾ fanden, daß stickstoffhaltige Steroidglykoside wie das Tomatin und das Demissin und die neuerdings von I. Löw entdeckten Alkaloidglykoside, die Leptinine, die sich von den unwirksamen Glykosiden Solanin und Chaconin durch eine größere Anzahl von OH-Gruppen im Aglykon unterscheiden, ebenfalls als Resistenzfaktoren gegen Kartoffelkäferfraß angesehen werden dürfen.

Es zeigte sich, daß diese Resistenzfaktoren in chemischer Hinsicht grundverschieden aufgebaut sein können, sich also von den verschiedensten Grundgerüsten ableiten. So stellte A. I. Virtanen im Rotklee ein Isoflavon fest, das die Pflanze gegen

1) A. I. VIRTANEN, Angew.Chem. 70, 544 (1958)

2) in R. KUHN, Naturwissenschaften 46, 43 (1959)

Pilzbefall durch Sclerotinia schützt. Man könnte demnach vermuten, daß vielleicht auch Flavone und deren Glykoside eine ähnliche Bedeutung im Leben dieser Pflanze zukommen dürfte. Überblickt man die aus *Solanum tuberosum* isolierten Naturstoffe, so zeigt sich, daß trotz ihrer großen Zahl verhältnismäßig wenig über die flavonischen Bestandteile der Kartoffel bekannt ist.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es daher, einen Beitrag zur Erforschung dieser Stoffgruppe in den oberirdischen Teilen der Kartoffelpflanze zu liefern.

II. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanze

Über dreißig Naturstoffe wurden aus *Solanum tuberosum* isoliert. Es handelt sich hauptsächlich um Zucker wie z. B. d-Chinose, Maltose, Solatriose, Chacotriose, ferner um Aminosäuren wie l(+)-Alanin, l(-)-Leucin, l(-)-Phenylalanin, l(-)-Threonin, l(-)-Tyrosin, l(+)-Glutamin, l(+)-Lysin, l(-)-Histidin, l(-)-Cystein und γ -Aminobuttersäure. Außerdem fand man Sterine wie β -Sosterin, Stigmasterin und andere Substanzen, z. B. Trigonellin, Glutathion, Cadaverin, Acetylcholin, Kreatinin, Protoporphyrin, Indolyl-3-acetaldehyd, Indolyl-3-acetonitril, Hypoxanthin, Adenin, Guanin, Allantoin, Vitamin B₁ und eine Reihe niederer Carbon-, Dicarbon- und Oxycarbonsäuren.

An Anthoxanthinen konnte bisher nur Rutin aus den weißen Blumenblättern isoliert werden³⁾.

Einige weitere Flavonolglykoside sind 1957 in unserem Arbeitskreis im Rahmen einer Übersichtsarbeit über die Familie der Solanaceen von E. MÜLLER⁴⁾ papierchromatographisch festgestellt worden.

3) H. TATSUTA u. M. MASUMARA, J.chem.Soc.Japan, pure Chem.Sect. 72, 70 (1951)

4) E. MÜLLER, Dissertation, München 1957

III. Prüfung von 25 Kartoffelsorten auf Flavonglykoside^{*)}

Von *Solanum tuberosum* konnten 25 Handelssorten, getrennt nach Blättern, Stengeln und Knollen papierchromatographisch in Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) untersucht werden. Blüten waren nicht in allen Fällen zu bekommen, daher unterblieb deren systematische Untersuchung.

In den Knollen fanden sich in keinem Falle Flavonoide. Die Stengel enthielten, wenn auch in geringerer Menge, die gleichen Flavone wie die Blätter.

Wie eine Hydrolyse ergab, handelte es sich bei den drei nachgewiesenen Flavonolglykosiden ausschließlich um **Q u e r - c e t i n g l y k o s i d e**.

In der stärksten Konzentration fanden sich diese drei Substanzen (Glykosid A, B und C) in den weißen Blumenblättern, weniger konzentriert in den grünen Laubblättern und am schwächsten in den Stengeln.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Verteilung der Anthoxanthine in den **B l ä t t e r n**.

T a b e l l e 1

Zeichenerklärung: + = schwache Konzentration
++ = mittelstarke Konzentration
+++ = starke Konzentration

Solanum tuberosum Handelssorte	Glykosid A	Glykosid B	Glykosid C
Ackersegen	+	+	+++
Adelheid	Spuren	Spuren	+
Agnes	++	+	+++
Amilla	+	+	+++
Apta	++	+	+++
Aquila	+	+	+++
Augusta	Spuren	Spuren	Spuren

*) Wir danken Herrn Direktor Dr. F. Sprau, Bayerische Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, München, für die freundliche Überlassung des Untersuchungsmaterials.

Tabelle 1, Fortsetzung

Solanum tuberosum Handelssorte	Glykosid A	Glykosid B	Glykosid C
Bella	+	+	+++
Benedicta	+++	+	+
Bona	+++	Spuren	Spuren
Carmen	+	++	+++
Falke	Spuren	Spuren	Spuren
Forelle	+++	++	++
Haida	+++	+	++
Maritta	+++	+	++
Oberambacher Frühe	+++	Spuren	Spuren
Oda	+++	Spuren	Spuren
Olympia	+++	+	+
Panther	+	++	+++
Robusta	++	++	+++
Roswitha	+	++	++
Sieglinde	+	++	++
Suevia	++	+	+++
Virginea	++	++	+++
Voran	++	+	+++

Die Tabelle 1 gibt über die quantitativen Verhältnisse der Flavonolglykoside in der jeweiligen Pflanze Auskunft. Vergleiche zwischen den einzelnen Sorten sind nur bedingt möglich. Es ist anzunehmen, daß sich die Konzentration der Flavone in den einzelnen Vegetationsperioden ändert, jedoch bestand im Rahmen unserer Arbeit kein Interesse, dieser Frage nachzugehen.

Glykosid A zeigte papierchromatographisch das gleiche Verhalten wie authentisches Rutin und verhielt sich auch beim Besprühen mit verschiedenen Reagenzien wie dieses.

Glykosid C: Der stark hydrophile Charakter von Glykosid C deutete darauf hin, daß der Zuckeranteil dieser Substanz verhältnismäßig groß sein muß. Es könnte sich also um ein Quercetin-

trisaccharid oder unter Umständen um ein Quercetintetrasaccharid handeln.

Glykosid B wies ähnliche R_f -Werte wie Rutin auf. Diese Substanz interessierte uns wegen ihres rutinähnlichen Verhaltens besonders. Sowohl ihre R_f -Werte als auch verschiedene Farbreaktionen auf dem Papier ließen die Annahme zu, daß ein Unterschied zu Rutin nur in der Natur des Disaccharids, nicht aber im Aglykon und in der Verknüpfungsstelle zwischen Aglykon und Zucker zu suchen ist. Es kam uns deshalb darauf an, eine Kartoffelsorte zu finden, in der vom Glykosid B genügend vorhanden war.

Von den, laut Tabelle 1 in Frage kommenden Pflanzen stand uns die Sorte C a r m e n in ausreichender Menge zur Verfügung, deshalb wählten wir diese für unsere Isolierungen aus.

Wir entschieden uns außerdem für eine Untersuchung der Blätter, da wir hier zugleich auch das R u t i n nachweisen wollten, welches aus Blüten bereits isoliert worden war⁵⁾.

IV. Glykosidisolierungen aus den Blättern von Solanum tuberosum,

Handelssorte Carmen

Nachstehendes Originalchromatogramm gibt die Verteilung der einzelnen Glykoside in den Blättern von Solanum tuberosum, Handelssorte Carmen, wieder. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Durethan BK 31 F-Pulver. Dieses neu entwickelte Verfahren ist im zweiten Teil der Arbeit ausführlich beschrieben. Das Chromatogrammbild zeigt einen wäßrigen Extrakt und dazwischen die Flecken der Testsubstanzen. Übersichtshalber haben wir an dieser Stelle die Glykoside B und C, deren Isolierung erst in einem späteren Kapitel beschrieben wird (s. S. 8), bereits vorweggenommen.

5) H. TATSUTA u. M. MASUMARA, J.chem.Soc.Japan, pure Chem.Sect. 72, 70 (1951)

<i>Extrakt</i>	<i>authent. Rutin</i>	<i>Extrakt</i>	<i>Glykosid B</i>	<i>Extrakt</i>	<i>Glykosid C</i>	
						0.69
						0.56
						0.44
						0.31

Abb. 1 : Chromatogrammbild eines wäßrigen Extrakts aus den Blättern von *Solanum tuberosum*.

Die Fluoreszenzen sind besonders gut bei Betrachtung im UV-Licht zu erkennen. Zum Entwickeln des Chromatogramms verwendeten wir ein mit Essigsäure angesäuertes System aus Methanol-Wasser, besprüht wurde mit einer 5%igen Aluminiumsulfatlösung.

1. Glykosid A

Aus 1,5 kg lufttrockener Droge gewannen wir nach erschöpfender Extraktion im Soxhlet und nach Abtrennung des Chlorophylls einen braunen, wäßrigen Extrakt. Zur Entfernung der Pflanzensäuren, vornehmlich Chlorogensäure⁶⁾ und Kaffeesäure eignete sich ein adsorptionschromatographisches Verfahren an Permutit-C-Säulen⁷⁾. Das Kunstharz adsorbierte aus der stark verdünnten wäßrigen Lösung die Flavonolglykoside, welche anschließend mit Methanol eluiert werden konnten, während die Pflanzensäuren in der wäßrigen Phase enthalten blieben.

Aus der methanolischen Fraktion resultierte nach Einengen und Verdünnen mit Wasser eine Flüssigkeit, aus der sich die Glykoside A und B durch Perforieren mit wassergesättigtem Äthylazetat anreichern ließen. Wir arbeiteten bei einem p_H -Wert zwischen 7 und 8, da genannte Substanzen im basischen oder stärker sauren Bereich besser wasserlöslich sind. Die endgültige Auftrennung der Flavonolglykoside glückte uns nach der Passage einer Zellosesäule⁸⁾; dieser Vorgang dauerte 25 Tage, der hierzu erforderliche Lösungsmittelverbrauch belief sich auf 25 l Äthylazetat.

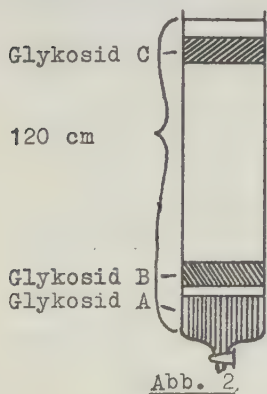


Abb. 2.

Nebenstehende Skizze gibt die Verteilung auf der Säule, kurz vor Abschluß der ersten Isolierung wieder. Nach dem Filtrieren, Einengen und Auflösen in wasserhaltigem Methanol kristallisierte das primär erhaltene Glykosid A aus silikonisiertem Gefäß bei Kühlschranktemperatur nach zwei Tagen in hellgelben Kristallbüscheln aus. Das Silikonisieren der Gefäße verhinderte die Abscheidung amorpher Substanz an der Gefäßwand. Die Ausbeute betrug 19 mg.

6) E. MÜLLER, Dissertation, München 1957

7) W. LEEB, Dissertation, München 1958

8) C. H. ICE, Th. B. GAGE u. S. H. WENDER, Proc. Oklahoma Acad. Sci. 32, 99 (1951)

Wir verarbeiteten nicht die ganze Menge des Extrakts, sondern nur ca. 1/20, da die geringe Kapazität der Zellsäule keine Isolierung in größerem Maßstab erlaubte.

2. Glykosid B

Die im vorigen Absatz beschriebene Zellsäule gab nach der Elution des Glykosids A bei weiterem Auswaschen mit wassergesättigtem Äthylazetat das Glykosid B frei, das auf die gleiche Weise wie Substanz A zur Kristallisation gebracht werden konnte. Hinzu kam jedoch noch eine vorhergehende endgültige Reinigung über besonders vorbehandeltes Ultramid. Die Bereitung dieses Ultramidpulvers ist in einem späteren Teil der Arbeit (s. S. 34) beschrieben.

Wir erhielten 25,4 mg Kristallisat. Die Substanz kristallisierte in langen, hellgelben Nadeln vom Schmelzpunkt 193° C.

3. Glykosid C

Dieses Anthoxanthin konnten wir nur in Lösung erhalten. Wir gewannen es aus Fraktionen, die durch Ausschütteln und Perforation bereits weitgehend von den Glykosiden A und B befreit waren. Die Trennung und Reinigung erfolgte in absteigender Chromatographie an Polyamidsäulen. Als Lösungsmittel verwendeten wir Wasser, für die anschließende Reinigung der eluierten Fraktion Methanol.

V. Identifizierung der unter IV isolierten Substanzen

Die Zugehörigkeit dieser Substanzen zur Gruppe der Flavonolglykoside ergab sich aus dem Reduktionstest nach R. WILLSTÄTTER und H. MALLISON⁹⁾, dem TAUBÖCK-Test¹⁰⁾ und dem Zirkon-Zitronensäuretest nach L. HÖRHAMMER und R. HÄNSEL¹¹⁾.

9) R. WILLSTÄTTER u. H. MALLISON, S.B.preuß.Akad.Wiss., physik.-math.Kl. 769 (1914)

10) K. TAUBÖCK, Naturwissenschaften 30, 439 (1942)

11) L. HÖRHAMMER u. R. HÄNSEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. Ges. 4/26, 276 (1951); ibid. 287/59, 310 (1954)

1. Glykosid A

Das Glykosid A identifizierten wir mit Hilfe von Testsubstanzen papierchromatographisch in verschiedenen Lösungsmitteln als Rutin. Das Vorhandensein dieser Substanz in den Blättern von *Solanum tuberosum* wurde bereits von E. MÜLLER¹²⁾ in einer Übersichtsarbeit über die Familie der Solanaceen angenommen. Sie wies auch beim Vergleich auf Durethanplatten, wo wesentlich andere Verhältnisse herrschen als auf dem Papier, keinen Unterschied zu authentischem Rutin auf. Ebenso stimmten Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt überein. UV-spektrophotometrisch und auf Grund der Hydrolyseergebnisse konnte dieser Befund noch weiter gesichert werden. Die Hydrolyse lieferte als Aglykon Quercetin und als Zuckeranteil Glukose und Rhamnose, bzw. Rutinose, wenn unter bestimmten Bedingungen gearbeitet wurde.

2. Glykosid C

Diese Substanz konnten wir nicht kristallin erhalten. Eine Reinisolierung wäre am Ende unserer Arbeit mit den Mitteln der aufsteigenden Chromatographie an Durethansäulen in präparativem Maßstab möglich gewesen. (Die Methodik ist in einem späteren Kapitel, S. 38 beschrieben). Wir benützten die Methode nur, um Substanz für UV-spektrophotometrische Messungen zu gewinnen.

Die Hydrolyse lieferte Glukose und Rhamnose, als Aglykon erhielten wir ebenfalls Quercetin.

Es ist möglich, daß im Falle dieses Quercetin-oligosaccharids bezüglich des Zuckeranteils ein Zusammenhang mit der von R. KUHN und Mitarbeitern gefundenen Chacotriose¹³⁾ besteht, da die Kartoffelpflanze auf Grund ihres Fermentsystems offensichtlich befähigt ist, ein derartiges Trisaccharid zu bilden. Die Chacotriose besteht aus 2 Mol Rhamnose und 1 Mol Glukose

12) E. MÜLLER, Dissertation, München 1957

13) R. KUHN, I. LÖW u. H. TRISCHMANN, Ber.dtsch.chem.Ges. 88 1960 (1955)

und bildet den Zuckerbestandteil des Alkaloidglykosids Chacomin, das sich hauptsächlich in *Solanum chacoense*, der Wildkartoffel, findet.

3. Identifizierung von Glykosid B

Der Nachweis des A g l y k o n s gelang papierchromatographisch. Das erhaltene Hydrolyseprodukt, das aus Substanzmangel nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, lieferte in sämtlichen angewandten Lösungsmittelsystemen Farbflecke, die sich in Laufhöhe und Farbe vor und nach dem Besprühen wie authentisches Q u e r c e t i n verhielten. (Weitere Identifizierung siehe S. 46).

Die Prüfung des Hydrolysats auf Zucker ergab nur G l u k o s e . Eine partielle Hydrolyse des Glykosids, mit dem Ziel, ein eventuell vorliegendes Disaccharid als Ganzes abzuspalten, glückte nach der Methode von G. ZEMPLÉN und A. GERECS¹⁴⁾ durch mehrstündiges Erhitzen mit verdünnter Essigsäure.

Die Tatsache, daß es gelang, das Disaccharid ungespalten zu erhalten, war für uns zugleich der Beweis, daß beide Zucker mit dem gleichen C-Atom des Flavonols verknüpft sind. Der Nachweis, daß die Verknüpfungsstelle am C-3 sein muß, ergab sich erstens aus den zu Beginn dieses Abschnittes erwähnten Testreaktionen und zweitens aus der im kurzweiligen Licht sichtbaren graubraunen Färbung der papierchromatographischen Fluoreszenzen des Glykosids. Außerdem nahmen diese Flecken nach dem Besprühen mit einer Lösung von basischem Bleiazetat eine Orangefärbung an. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine Verknüpfung am C-3.¹⁵⁾

Unser Bestreben war nun, eine vollständige Aufklärung des Glykosids durchzuführen. Dazu mußten wir die Frage klären, mit welchem D i s a c c h a r i d unser Aglykon verglykosidiert ist.

14) G. ZEMPLÉN u. A. GERECS, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 2520 (1938)

15) W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959, S. 27

Zur Strukturaufklärung für Disaccharide sind verschiedene Methoden möglich. Die klassische chemische Methode der Methylierung und anschließenden Säurehydrolyse, nach der man durch Schmelzpunktvergleich der partiell methylierten Monosen mit Testsubstanzen und verschiedenen anderen, chemischen Methoden die Struktur beweisen kann, war in unserem Fall nicht möglich, da wir über zu wenig Ausgangssubstanz verfügten.

Eine weitere Möglichkeit bot die Papierchromatographie, mit deren Hilfe wir schon einige Anhaltspunkte gewinnen konnten. Doch erst die zweite Methode, der Vergleich unseres Zuckers mit Testsubstanzen auf papierelektrophoretischem Wege brachte, ergänzt und bestätigt durch die Ergebnisse der Papierchromatographie, die Gewißheit, welches Disaccharid Bestandteil unseres Glykosids B ist.

a) Papierchromatographische Untersuchung des Disaccharids aus Glykosid B

Wir benutzten zwei Lösungsmittelsysteme für die Chromatographie der Zucker: Pyridin-Äthylazetat-Wasser und sek. Butanol-Eisessig-Wasser.

Ersteres eignet sich für die Trennung von Monosacchariden, eine Unterscheidung von Disacchariden ist hiermit nicht möglich. Das zweite System dagegen trennte die Disaccharide sehr gut. Wir arbeiteten mit Durchlaufchromatogrammen und wählten eine Laufzeit von 120 Stunden.

In diesem System zeigte das abgespaltene Disaccharid aus unserer Substanz den gleichen R_F -Wert, wie authentische S o p h o r o s e ¹⁶⁾.

Eine Zusammenstellung der R_F -Werte von Glukosido-Glukosen ist in nachstehender Tabelle gegeben.

T a b e l l e System: sek. Butanol-Eisessig-Wasser (5+3+2)

Zucker	Mal- tose	Cello- biose	Gentio- biose	Laminari- biose ¹⁶⁾	Sopho- rose	Disaccharid aus Glyk. B	Glukose
cm	19,0	17,4	15,5	22,3	19,8	19,8	30,3

16) Wir danken Herrn Professor Dr. K. Freudenberg für die uns zur Verfügung gestellten synthetischen Testsubstanzen.

Die Zahlenangaben der Tabelle geben die Entfernung in cm von der Startlinie an. Sie sind aus fünf Durchlaufchromatogrammen entnommen und stellen Mittel- bzw. Verhältniswerte dar.

Die Tabelle zeigt zwar eine genaue Übereinstimmung der R_f -Werte unserer Substanz und der Sophorose, doch ist der Unterschied zu den anderen Zuckern teilweise nicht sehr groß. Da uns eine rein papierchromatographische Aufklärung zu wenig exakt erschien, verzichteten wir darauf, weitere Lösungsmittelsysteme heranzuziehen. Wir wählten deshalb ein papierelektrophoretisches Trennverfahren für Zucker für unsere weiteren Untersuchungen aus, da dieses von wesentlich anderen Faktoren abhängig ist.

b) Papierelektrophoretische Untersuchung des Disaccharids aus Glykosid B

Die Papierelektrophorese, die sich schon in einer Reihe von Arbeiten als wertvolles Hilfsmittel zur Trennung und Entdeckung von Kohlenhydraten bewährt hat, erwies sich auch in unserem Fall als zweckmäßig. Besonders die Arbeiten von L. JAENICKE¹⁷⁾, H. MICHL¹⁸⁾ und R. CONSDEN und W. M. STANIER¹⁹⁾, welche die Bedeutung der Boratpuffer für die Trennung der Zucker aufzeigten, waren eine wichtige Weiterentwicklung auf diesem Gebiet.

Die Zuckermoleküle, die meist elektrisch neutral reagieren, zeigten in früher verwandten Lösungsmitteln, z. B. 0,01 n Ammoniak, keine oder nur geringe Wanderungsgeschwindigkeit und lieferten keine scharfen Zonen.

Anders liegt der Fall, wenn ein Boratpuffer verwendet wird²⁰⁾. In wäßriger Boratlösung herrscht folgendes Gleichgewicht:



17) L. JAENICKE, Naturwissenschaften 39, 86 (1952)

18) H. MICHL, Mh.Chem. 83, 737 (1952)

19) R. CONSDEN u. W. M. STANIER, Nature (London) 169, 783 (1952)

20) J. BOESSEKEN, Recueil Trav.chim.Pays-Bas 61, 82 (1942);
Advances Carbohydrate Chem. 4, 189 (1949)

Das Gleichgewicht ist in Borsäurelösung stark nach links verschoben. Bei ansteigendem p_H bildet sich jedoch die ionisierte Form des Borkomplexes in stärkerem Maße aus. Diese Form, die befähigt ist, in einem elektrischen Feld zu wandern, kann nun mit alkoholischen OH-Gruppen eine Reihe von Komplexen bilden, deren Zahl am Zuckermolekül von der stereochemischen Beschaffenheit des Kohlenhydrats²⁰⁾ abhängig ist. Nach R. CONSDEN und W. M. STANIER²¹⁾ bilden sich die schärfsten Zonen beim Arbeiten in einem p_H -Bereich zwischen 9 und 10 aus. Dagegen sollen die bei niedrigeren p_H -Werten entwickelten Zuckerflecken auf Pherogrammen unscharf sein und Schwanzbildung zeigen. Consden führte dies auf das Vorhandensein mehrerer Arten von Komplexen zurück.

A. B. FOSTER²²⁾ gibt eine Tabelle, woraus hervorgeht, daß Glukose, die am C-2 oder C-4 methyliert ist, wesentlich geringere MG-Werte^{*)} aufweist als die Methyläther an C-3 oder C-6. Diese Versuche führte der Autor bei p_H 10 und einer Spannung von 900 Volt aus. Ebenso wird aus der Tabelle ersichtlich, daß die MG-Werte der Maltose und Cellobiose nur ungefähr ein Drittel derjenigen der Gentiobiose und Laminaribiose ausmachen.

J. I. FRAHN und J. A. MILLS²³⁾ zeigten anhand einer Tabelle das Verhalten von mehrwertigen Alkoholen in Boratpufferlösungen bei p_H 9,2. Hieraus, sowie aus einer Reihe von Arbeiten anderer Autoren ist zu entnehmen, daß die Ausbildung von Boratkomplexen in umso stärkerem Maße erfolgt, je mehr vicinale OH-Gruppen vorhanden sind.

Unsere Untersuchungen, die durch zahlreiche Literaturangaben bestätigt wurden, brachten uns zu dem Schluß, daß die beständigsten Komplexe als Verbindungen mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, dann ausgebildet werden, wenn zwei cis-OH-Gruppen tragende C-Atome durch ein weiteres Kohlenstoffatom getrennt sind. In diesem Fall

20) J. BOESEKEN, Recueil Trav.chim.Pyas-Bas 61, 82 (1942);
Advances Carbohydrate Chem. 4, 189 (1949)

21) R. CONSDEN u. W. M. STANIER, Nature (London) 169, 783 (1952)

22) A. B. FOSTER, J.chem.Soc.(London) 982 (1953)

23) J. I. FRAHN u. J. A. MILLS, Chem.and Ind. 578 (1956)

*) $MG\text{-Wert} = \frac{\text{Abstand der Substanz vom Start}}{\text{Abstand der Glukose vom Start}}$

ist nämlich am ehesten die Möglichkeit zur Ausbildung von stabilen 6-Ringen gegeben. Theoretische Vergleiche nach Literaturwerten ergaben, daß die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Verbindungen auch gegenüber Verbindungen, die pro Mol zweimal die Fähigkeit haben, 5-Ringe auszubilden, noch größer ist. Abbildung 3 zeigt die zur Diskussion gestellte Formel:

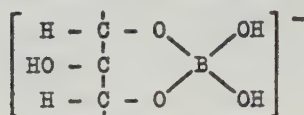


Abb. 3

Eigene Untersuchungen:

Wir fertigten von den Testsubstanzen: Glukose, Maltose, Cellobiose, Gentiobiose, Laminaribiose, Sophorose und dem Glykosid-B-Zucker Pherogramme an. Unter den angewandten Bedingungen fand bei den 1,3 und 1,6 verknüpften Zuckern offensichtlich in wesentlich stärkerem Maße Komplexbildung statt, als bei Cellobiose, Maltose und Sophorose (1,4 und 1,2 Verknüpfung). Wir wählten nach einer Reihe von Versuchen einen p_H von 8,25 und legten eine Spannung von 110 Volt für 12 bis 14 Stunden an. Eine höhere Spannung war bei diesem p_H -Wert nicht mehr möglich, da sich durch die stärkere Wärmeentwicklung und die dadurch bedingte starke Verdunstung von der Papieroberfläche freie Borsäure in störenden Mengen in der Mitte des Pherogramms gesammelt hätte.

Der p_H -Wert, den wir so niedrig als möglich wählten, stellte gewissermaßen einen Grenzwert dar für die Trennung der starken und der schwachen Komplexbildner unter den Disacchariden. Die starken Komplexbildner, Gentiobiose und Laminaribiose, bei denen zweimal pro Mol die zweite und vierte OH-Gruppe frei ist, wanderten erwartungsgemäß zur Anode, während die übrigen untersuchten Zucker bereits dem Einfluß des elektroendoosmotischen Stromes unterlagen und diesem in Richtung Kathode folgten.

Bei einem etwas höheren p_H -Wert (8,65) zeigte die Maltose noch eine schwache Bewegung in Richtung Anode.

Die Photographien (Abb. 4) beweisen die Richtigkeit der Annahme, daß bei geringerer Alkalität der Boraxlösung eine Trennung der Komponenten in zwei Gruppen unter dem Einfluß der entgegengesetzt wirkenden Kräfte, Ionophorese einerseits und Elektroendoosmose andererseits, möglich ist.

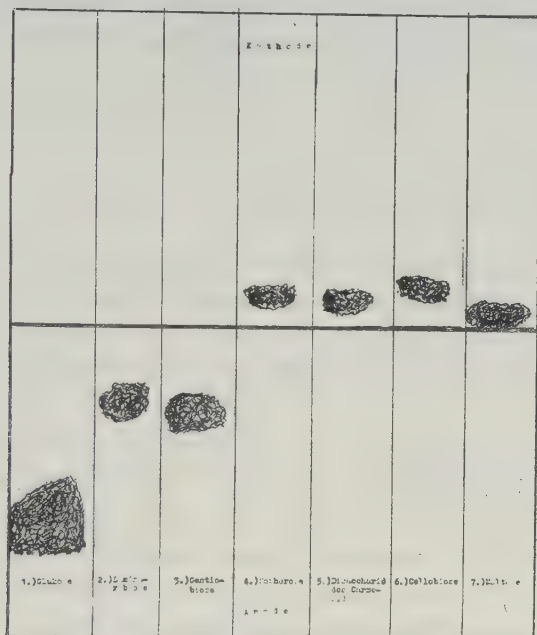


Abb. 4 : Pherogramme verschiedener Disaccharide, besprüht mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

Auswertung des Ergebnisses:

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen zeigten eindeutig, daß von den untersuchten Zuckern nur Cellobiose, Maltose und Sophorose dem in Frage kommenden Disaccharid entsprechen konnten. Das Vorhandensein der Maltose war jedoch von vornherein fraglich, da bisher, außer bei einigen Herzgiftglykosiden, noch keine α -glykosidisch verknüpften Zucker als Glykosidkomponenten in der Natur gefunden wurden.²⁴⁾

24) F. MICHEEL, "Chemie der Zucker und Polysaccharide", Leipzig 1956

Die papierchromatographischen und papierelektrophoretischen Untersuchungen, mit deren Hilfe wir die Zahl der möglichen Zucker zwar verkleinern konnten und deren Ergebnisse mit einiger Wahrscheinlichkeit auf Sophorose deuteten, bedurften noch der Bestätigung durch die Synthese. Wir versuchten deshalb, die außer Sophorose noch in Frage kommenden Zucker mit Quercetin zu verknüpfen.

VI. Synthese von Quercetindiglukosiden

1.) In der Zuckerliteratur finden wir eine Reihe von Verfahren zur Synthese von Glykosiden. Diese Vorschriften erwiesen sich zum Teil auf Grund theoretischer Überlegungen oder nach vorangegangenen, ergebnislosen Versuchen für Flavone als untauglich.

Eine kurze Übersicht über die einzelnen Verfahren und die Gründe ihres Versagens sei im folgenden gegeben.

- a) Das klassische Verfahren der Herstellung von Glykosiden der niederen Alkohole in Gegenwart einer katalytischen Menge Salzsäure²⁵⁾ wurde nicht versucht, da einmal in der Literatur keinerlei Hinweise über gelungene Synthesen mit höheren Phenolen vorlagen, zum anderen kein Lösungsmittel existiert, das selbst nicht reagiert, und in dem beide Komponenten löslich sind.
- b) Eine weitere Möglichkeit bot die Methode von B. HELFERICH²⁶⁾, der die Kondensation von Aglykon und Zucker unter dem katalytischen Einfluß der p-Toluolsulfonsäure stattfinden ließ. Diese Reaktion, die in der Vakuumschmelze ausgeführt wurde, brachte ebenfalls kein positives Ergebnis, da der Schmelzpunkt des Quercetins so hoch liegt, daß die im Reaktionsgemisch verwendeten Zuckerazetate aus diesem heraussublimierten, sich zum Teil auch zersetzten.

25) E. FISCHER, Ber.dtsch.chem.Ges. 28, 1145, 1151 (1895)
T. S. PATTERSON u. J. ROBERTSON, J.chem.Soc.(London) 300 (1929)

B. HELFERICH u. SCHÄFER, Organ.Synthese 1, 356 (1932)

26) B. HELFERICH u. SCHMITZ-HILLEBRECHT, Ber.dtsch.chem.Ges. 66, 578 (1933)

- c) E. FISCHER gelang es, eine Reihe von Phenol- und Alkoholglykosiden zu erhalten, indem er die Azetohalogenzucker mit der betreffenden Hydroxylverbindung in wasserfreiem Medium unter Zusatz von Silberoxyd, bzw. Silberkarbonat als Säureakzeptoren umsetzte²⁷⁾. Wir mußten feststellen, daß diese Substanzen mit Quercetin, vermutlich unter Chinonbildung reagieren²⁸⁾. Ein Ersatz dieser Substanzen durch Chinolin²⁹⁾ führte ebenfalls zu keiner Umsetzung in der gewünschten Weise. Die Methode, die möglicherweise durch Zugabe geeigneter Katalysatoren³⁰⁾ doch noch erfolgreich zu gestalten gewesen wäre, wurde aufgegeben, da ein anderes Verfahren (siehe S. 18) in eleganter Weise die Lösung des Problems brachte.
- d) Sehr einfach erscheint die Kondensation von Aglykon und Zucker durch Erhitzen bei Anwesenheit eines Kationenaustauschers³¹⁾. Das Verfahren ist aber nur bei niederen Alkoholen erfolgversprechend und stand aus den gleichen Gründen wie die Reaktion unter a) nicht zur Diskussion.
- e) J. BOURQUELOT und Mitarbeiter³²⁾ zeigten in ihren Arbeiten auf, daß es möglich ist, Glykoside durch Reaktion von Alkohol, bzw. Phenol mit dem freien Zucker in wasserarmem Medium zu erhalten. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von Fermenten. Nach diesen Autoren besteht folgendes Gleichgewicht: Zucker + Aglykon $\xrightleftharpoons{\text{Enzym}}$ Glykosid + Wasser.
- Beim Arbeiten in alkoholischem Milieu läßt sich das Gleichgewicht im Sinne des Massenwirkungsgesetzes nach rechts verschieben.
- Als Carbohydrase verwendeten wir Süßmandelemulsin, eine β -Glukosidase. Verschiedene Versuchsanordnungen, z. B. Anschlämmung der Komponenten in wenig Wasser, in wäßrigem Azeton und feinste Verteilung des Quercetins mittels eines neutralen
-
- 27) E. FISCHER u. E. F. ARMSTRONG, Ber.dtsch.chem.Ges. 34, 2885 (1901); E. FISCHER u. v. MECHTEL, ibid. 49, 2813 (1916)
- 28) B. SALFNER, Dissertation, München (in Vorbereitung)
- 29) R. BOGNAR u. V. SZABO, Acta chim.Acad.Sci.hung. 4, 383 (1954)
- 30) N. H. FERGUSON u. J. H. GARDNER, J.Amer.chem.Soc. 72, 2877 (1950)
- 31) B. HELFERICH u. K. F. WEDEMAYER, Ber.dtsch.chem.Ges. 83, 538 (1950)
- 32) I. E. CADOTTE, F. SMITH u. D. SPRIESTERSBACH, J.Amer.chem. Soc. 74, 1501 (1952)
- 32) Eine Übersicht über die Arbeiten von J. BOURQUELOT und Mitarbeitern aus den Jahren 1912-1917 ist gegeben in: Ann.chim. 3, 287 (1915); 4, 310 (1915); 7, 153 (1917)

Emulgators ergaben keine Reaktionen. Bedeutung erlangte das Verfahren für uns dadurch, daß es uns erlaubte, die im Handel sehr teure Gentiobiose auf reversionssynthetischem Wege nach der Vorschrift von J. BOURQUELOT und H. HERISSEY³³⁾ zu gewinnen. Wir benötigten diesen Zucker als Testsubstanz für die Identifizierung des Glykosids B. Die Ausbeute betrug ungefähr 15 bis 20 g Rohprodukt, ausgehend von 270 g Glukose.

2. Methode von C. H. ICE und S. H. WENDER³⁴⁾

Erfolgversprechend war die Methode von C. H. Ice und S. H. Wender. Den beiden amerikanischen Autoren gelang es, unter Verwendung von flüssigem Ammoniak als Lösungsmittel, Quercetin-Kalium und Monoacetobromglukose zum Isoquercitrin zu verknüpfen.

a) Herstellung des Quercetin-Kaliums

Quercetin bildet als phenolischer Körper mit Alkali ein Salz. Bei Einhaltung eines bestimmten p_H -Wertes gelangt man nur zum Monokaliumsalz und zwar erfolgt die Umsetzung am C-3-Atom.

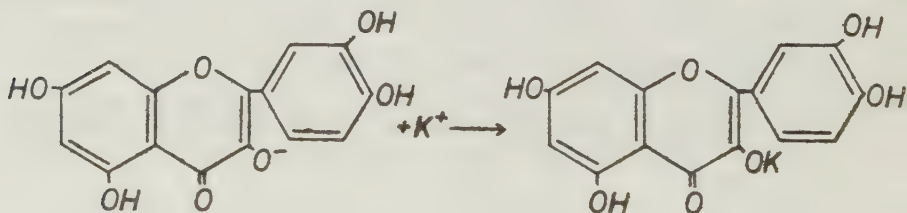


Abb. 4

Dies ist verständlich, da der Wasserstoff der Hydroxylgruppe am C-3 infolge der Nachbarschaft der negativen Carbonylgruppe am leichtesten abdissozierbar ist.

Eigene Versuche zeigten, daß die Löslichkeit der Quercetinalkalisalze in flüssigem Ammoniak vom Quercetin über das

33) J. BOURQUELOT u. H. HERISSEY, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 157, 732 (1913); G. ZEMPLEN, Ber.dtsch.chem.Ges. 48, 233 (1915).

34) C. H. ICE u. S. H. WENDER, J.Amer.chem.Soc. 74, 4606 (1952)

Quercetin-Natrium zum Quercetin-Kalium zunimmt. Theoretisch müßten sich infolgedessen die Ausbeuten steigern lassen, wenn man als Alkalimetall Caesium oder Rubidium verwendet. Wir bevorzugten trotzdem die beiden leichteren Metalle und kompensierten die schlechtere Löslichkeit durch einen großen Überschuß an flüssigem Ammoniak. Außerdem versuchten wir, die alkoholische Lauge durch entsprechende Alkalialkoholate zu ersetzen, insbesondere für die Gewinnung des Natriumsalzes, da Natriumhydroxyd in Alkohol schwerer löslich ist. Eine Erhöhung der Ausbeute gegenüber der Laugenfällung machte sich jedoch nur in geringem Maße bemerkbar.

b) Darstellung der Acetobromzucker

Es gibt eine Reihe von Methoden, um die Acetohalogenverbindungen zu erhalten. Man kann hier der Acetobromierung in einem Arbeitsgang die einleitende Acetylierung der Zucker und nachfolgende Bromierung (richtiger: Umesterung) am acetalischen OH derselben gegenüberstellen.

Beide Möglichkeiten wurden versucht. Die besseren Ausbeuten ergaben sich jedoch bei der Bromierung eines bereits vorliegenden Acetats. Eine Auswahl des Verfahrens im Hinblick auf die sterische Konfiguration am C-1 des entstehenden Acetats wurde nicht getroffen, da bei der folgenden Halogenierung in jedem Fall die stabilere α -Form des Halogenids entsteht.

Wir bedienten uns im Falle der Maltose und Cellobiose der Methode von M. BARCZAI-MATOS und F. KÖRÖSY³⁵⁾, deren Prinzip hier kurz beschrieben sei: Die Bildung des Octaacetats erfolgt in Essigsäureanhydrit mittels 72%iger Chlorsäure³⁶⁾ als Katalysator in der Kälte. Aus zugefügtem roten Phosphor, Brom und Wasser entsteht über das Phosphorpentabromid Bromwasserstoff, der sich infolge einer Umesterung mit dem Essigsäurerest der acetalischen OH-Gruppe am C-1 der Zucker austauscht.

35) M. BARCZAI-MATOS u. F. KÖRÖSY, Nature (London) 165, 369 (1950)

36) D. KRÜGER u. W. ROMAN, Ber.dtsch.chem.Ges. 69, 1830 (1936)

Verlustreich gestaltete sich die Methode insofern, als das Reaktionsprodukt länger der Gegenwart von Wasser ausgesetzt werden mußte und dadurch teilweise die Kohlenstoff-Brom-Bindung zersetzt wurde.

Um zur Acetobromgentiobiose zu gelangen, stellten wir uns zunächst das Octaacetat des Zuckers her. Die Acetylierung führten wir mit Natriumazetat und Essigsäureanhydrit durch³⁷⁾.

An dieser Stelle konnten wir auch die Identität unseres selbst hergestellten Zuckers beweisen. Wir sublimierten das umkristallisierte Octaacetat der Gentiobiose in einem 20 cm langen, unten zugeschmolzenem Glasröhrchen im heißen Paraffinbad, bei einem Unterdruck, der sich mit der Wasserstrahlpumpe erzeugen ließ^{*)}. Das erhaltene Sublimat zeigte im Schmelzpunkt genaue Übereinstimmung mit dem Literaturwert für β -Gentiobiose-octaacetat.

Die Bromierung gelang in einer Abwandlung des Verfahrens von K. FREUDENBERG³⁸⁾ in der Weise, daß das Zuckeracetat nicht mit Bromwasserstoff/Eisessig umgesetzt wurde, sondern mit einer Lösung von Phosphorpentabromid in Eisessig unter Zusatz von etwas rotem Phosphor, der die Bildung von freiem Brom verhindern sollte. Diese Arbeitsweise hat gegenüber der Acetobromierung in einem Arbeitsgang den Vorteil, daß nach dem Filtrieren und Verdünnen mit Wasser sofort abgesaugt und getrocknet werden kann.

Die Aufbewahrung der hergestellten Verbindungen erfolgte, vor Licht und Feuchtigkeit geschützt, bei einer Temperatur von -20° C.

c) Bemerkungen zur Synthese der Quercetin-3-diglukoside

Die Vereinigung der Komponenten geschieht in flüssigem Ammoniak, der ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für die Aceto-

37) W.N.HAMOTH u. B.WYLLAM, J.chem.Soc.(London) 123, 3120 (1923)

38) K.FREUDENBERG, A.NOE u. E.KNOFF, Ber.utsch.chem.Ges. 66, 238 (1927).

*) Diese Arbeitsweise führten wir mit Erfolg in das pharmakognostische Praktikum für Studenten der Pharmazie ein. Es bewährte sich in Fällen, in denen es galt, sublimierbare Pflanzeninhaltsstoffe, z.B. Coffein, Hydrochinon usw. für papierchromatographische Nachweise und chemische Testreaktionen direkt aus der Droge rein zu erhalten.

halogenzucker darstellt und in dem auch die Quercetinalkalisalze löslich sind. Um eine sehr weitgehende Lösung dieser Salze zu erreichen, arbeiteten wir mit einem Überschuß von 400% der angegebenen Menge an Lösungsmittel. Wesentlich ist auch absolute Trockenheit des Reaktionsgemisches. Das Ammoniakgas, das wir zu Beginn unserer Versuche noch durch Umsetzung von Ammoniumchlorid mit Natriumhydroxyd gewannen, später jedoch in Stahlflaschen bezogen, trockneten wir mehrfach über Natriumhydroxyd und Calciumspänen, bevor es in einer Kühlfalle kondensiert wurde.

Die Isolierung der gebildeten Glykoside aus dem Reaktionsgemisch bereitete ebensolche Schwierigkeiten wie die Isolierung der natürlichen Glykoside. Es ergaben sich zwei Möglichkeiten des Vorgehens, die beide versucht wurden.

- a) Nach nicht vollständigem Abdunsten des Ammoniaks setzten wir Methanol zu; in der ammoniakalischen Lösung erfolgte beim Stehen Desacetylierung. Die Reinigung geschah in einem zeitraubenden Prozeß durch Perforation mit Äther (um überschüssiges Quercetin zu entfernen), Äthylacetat und schließlich adsorptionschromatographisch an Ultramidsäulen.
- b) Wir entfernten den Ammoniak vollständig und erhielten auf diese Weise ein noch unversehrtes Acetylglykosid neben bereits desacetyliertem Produkt. Bei weiterer Reinigung erstgenannter Substanz gelangten wir zu einem chromatographisch annähernd reinen Octaacetylglykosid, das nach der von G. ZEMPLEN³⁹⁾ angegebenen Methode von Acetylgruppen befreit werden konnte. Diesem Verfahren, das außerdem sehr schonend ist, gaben wir deshalb den Vorzug, weil die Substanzlösung hierbei sehr wenig durch anorganische Bestandteile verunreinigt wurde.

Zur weiteren Reinigung bedienten wir uns ebenfalls der Adsorptionschromatographie an Ultramidsäulen. Wir eluierten mit Methanol, engten das Eluat im Vakuum ein und wiederholten den Vorgang zweimal. Von den beiden synthetisierten Glykosiden konnten wir das Quercetincellobiosid kristallin erhalten. Die Ausbeute

39) G. ZEMPLEN, Ber.dtsch.chem.Ges. 56, 1705 (1923); 59, 1258 (1926); 69, 1827 (1936)

betrug 51 mg. Das Quercetinmaltosid gewannen wir in annähernd gleicher Ausbeute, jedoch nur in amorphem Zustand.

d) Versuche zur Synthese eines Quercetin-3-gentiobiosids

Die Synthese eines Gentiobiosids erwies sich auf Grund der eindeutigen Unterscheidungsmöglichkeiten für Disaccharide, die uns Papierchromatographie und Papierelektrophorese boten, als nicht notwendig. Wir versuchten diese Kondensation trotzdem, da sie uns eine Substanz geliefert hätte, die unter Umständen mit einem von K. HAYASHI und K. OUCHI⁴⁰⁾ gefundenen Quercetin-3-glukosidoglukosid (siehe S. 27) identisch gewesen wäre.

Die papierchromatographische Untersuchung des Reaktionsgemisches zeigte jedoch eine derartige Menge von Nebenprodukten und Verunreinigungen an, daß wir auf die Isolierung der eventuell gebildeten Substanz verzichteten.

VII. Vergleich von Glykosid B mit den Syntheseprodukten

1. Papierchromatographischer Vergleich

Der papierchromatographische Vergleich der Syntheseprodukte mit der isolierten Substanz bewies, daß Quercetin-3-cellobiosid und Quercetin-3-maltosid mit dem Glykosid B nicht identisch sind. Im System Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) fanden wir zwar nahezu die gleichen R_F -Werte; ein deutlicher Unterschied machte sich jedoch in dem System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)⁴¹⁾ bemerkbar. Ebenso verschieden war die Laufhöhe auf Durethan-Dünnschichtchromatogrammen (siehe Teil B), von denen zwei im Original der Arbeit beigelegt sind

Mit dem Ausscheiden dieser beiden Substanzen, sowie durch die Papierelektrophorese und den papierchromatographischen Vergleich der Zucker im System sek. Butanol-Eisessig-Wasser (5+3+2) (siehe S. 11) war der Beweis geführt, daß wir ein Quercetin-3-sophorosid isoliert hatten.

40) K. HAYASHI u. K. OUCHI, Misc.Repts.Research Inst.Nat. Resources (Japan) 11, 41 (1948)

41) L. HÖRNER, H. WÄGNER u. H. GÖTZ, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz. Ges. 291/63, 44 (1958)

Ein Enzymversuch zur Abspaltung der Zuckerkomponente gelang uns auf dem Papier mit Süßmandelemulsin. Aus der Tatsache, daß unser Glykosid durch eine β -Glukosidase gespalten wird, schlossen wir, daß unsere Substanz B ein Q u e r c e t i n - 3 - (β) s o p h o r o s i d darstellt.

Untenstehende Abbildung 5 ist ein Dünnschichtchromatogramm auf DURETHAN BK 31 F (Bayer). Es zeigt folgende Substanzen:

- | | |
|------------------------|----------------------------|
| 1) Authentisches Rutin | 4) Quercetin-3-cellobiosid |
| 2) Meratin (s. S. 27) | 5) Glykosid B |
| 3) Isoliertes Rutin | 6) Quercetin-3-maltosid |

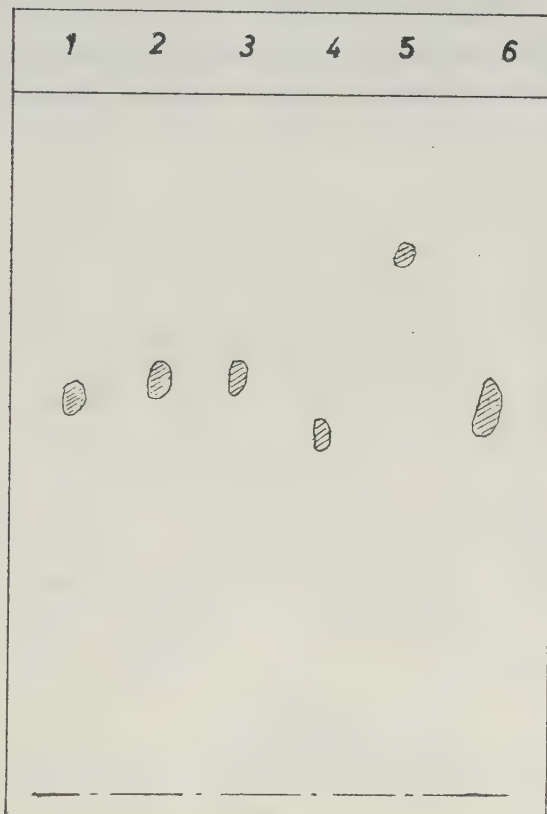


Abb. 5

Laufmittel: Methanol-Eisessig-Wasser (19+1+1)
 Sprühreagens: Liqu. Aluminii acetic, DAB 6

Vergleich der R_F -Werte in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen:

Tabelle 2

System	Glykosid B	Cellobiosid	Maltosid	Meratin	Rutin
AAW	0,48	0,48	0,49	0,53	0,53
IAW	0,75	0,64	0,65	0,67	0,67

AAW = Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3), Oberphase

IAW = Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (10+2+3), einphasig.

2. IR-spektroskopischer Vergleich

Ein weiteres wichtiges Hilfsmittel zur Ausscheidung des Cellobiosids bot uns der IR-spektroskopische Vergleich mit Glykosid B.

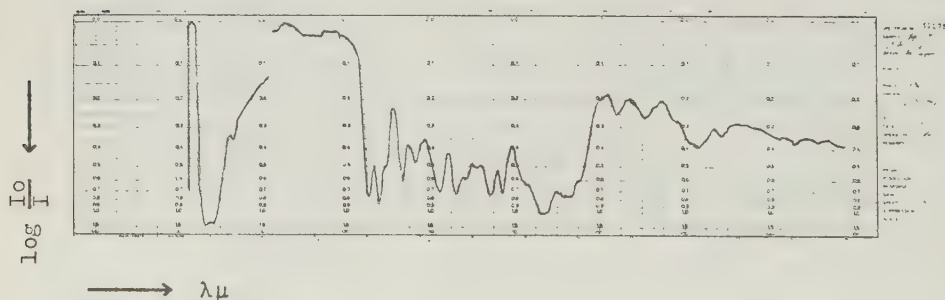


Abb. 6 : Glykosid B

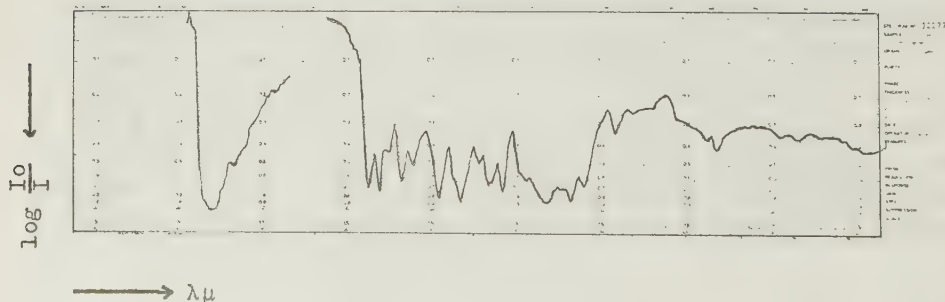


Abb. 7 : Quercetin-3-cellobiosid

Die IR-Spektren stimmen in ihren wesentlichen Teilen überein. Beide zeigen die für Flavonole charakteristische C=O-Bande bei 1660 cm^{-1} . Eine Abweichung ist im Bereich von $1100 - 880\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, der für die C-O-Valenzschwingungen der Zucker verantwortlich ist. Diese Abweichung tritt besonders bei 1020 , 990 und $890\text{ m}\mu$ auf. Die Unterschiedlichkeit der IR-Spektren in diesem Bereich ist als weiterer Beweis dafür anzusehen, daß sich die beiden Substanzen wohl nur in der Konfiguration des Zuckeranteils unterscheiden dürften.

3. UV-spektrophotometrische Untersuchungen

Die UV-Spektren sämtlicher, in dieser Arbeit behandelten Flavonolglykoside sind in den folgenden Abbildungen wiedergegeben.

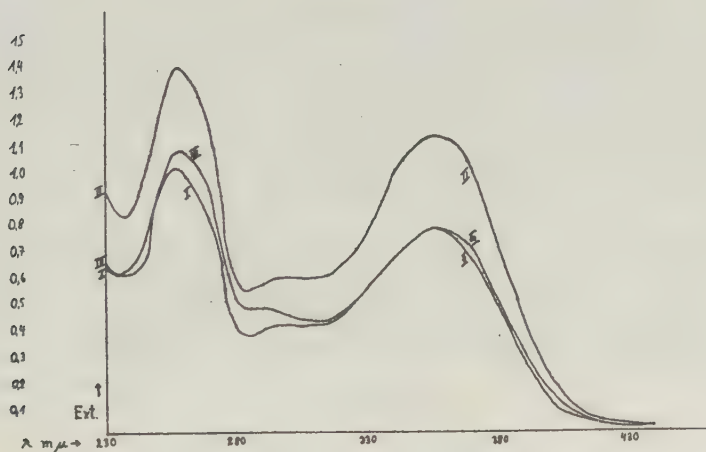


Abb. 8

I = Glykosid B; II = Cellobiosid; III = Maltosid

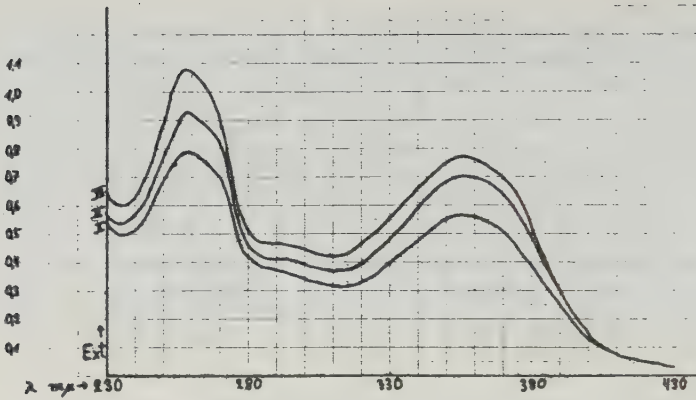


Abb. 9

I = Rutin, authentisch; II = Rutin, isoliert; III = Maltosid

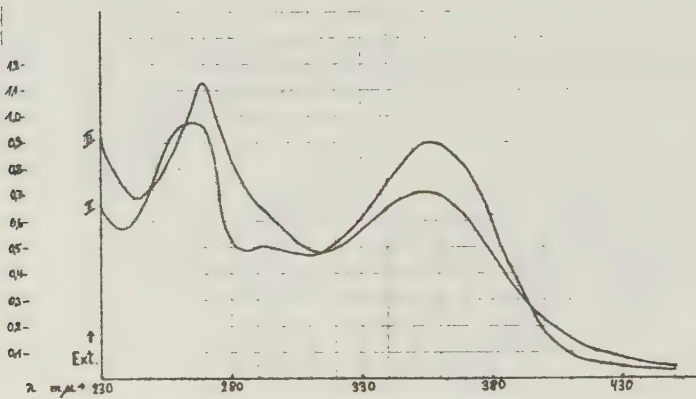


Abb. 10

I = Meratin; II = Glykosid C

Tabelle 3 : Lage der Maxima I und II in mμ

	Glyk.B	Cellobios.	Maltos.	Rut.auth.	Rut.isol.	Meratin	Glyk.C
I	256,5	257	258	257	258	265	268
II	355	355	355	355	355	355	355

Die übereinstimmend bei 257 bzw. 258 und 355 m μ vorhandenen Maxima bestätigen, daß es sich bei allen Substanzen um Flavonol-3-glykoside handelt⁴²⁾⁴³⁾. Lediglich das Glykosid C und das Meratin zeigen eine geringe Verschiebung des Maximums I, die auf Verunreinigungen zurückgeführt werden kann. Aus Abbildung 10 (S. 26) ist zu ersehen, daß im Falle von Glykosid C ein stärkerer Unterschied in der Höhe der beiden Maxima vorliegt. Dies deutet darauf hin, daß mehr als zwei Monosaccharidreste mit dem Aglykon verbunden sind. Dagegen verhalten sich die übrigen Substanzen, mit Ausnahme des Meratins, ähnlich wie das Diglukosid Rutin.

4. CH-Bestimmung

Die CH-Bestimmung ergab für die zwei untersuchten Glykoside, Glykosid B und Quercetin-3-cellobiosid, folgende Werte:

Glykosid B: gef.: C = 50,11% H = 5,37%

Cellobiosid: gef.: C = 50,72% H = 5,31%.

Wegen Substanzmangel mußte auf mehrmaliges Umkristallisieren verzichtet werden, infolgedessen konnten wir die Glykoside nicht in der für die CH-Bestimmung erforderlichen Reinheit erhalten. Dies erklärt die abweichenden Werte, die sich bei theoretischer Berechnung ergaben (ber.: C = 51,8%, H = 4,8%).

Bisher haben wir die Isolierung und Identifizierung des Glykosids B beschrieben. Es galt nun noch zu untersuchen, ob diese Substanz mit dem schon erwähnten "Meratin" identisch ist, das 1948 von K. HAYASHI und K. OUCHI⁴⁴⁾ aus den Blüten von *Meratia praecox* isoliert worden ist.

VIII. Vergleich von Meratin und Glykosid B

Wir verglichen die beiden Substanzen in der Hauptsache papierchromatographisch in verschiedenen Lösungsmitteln und dünn schichtchromatographisch auf Durethan BK 31 F -Platten. Das Meratin erwies sich in beiden Fällen als nicht identisch mit unserem

42) L.MARCHLEWSKI u. B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 297, 56 (1938)

43) K.PAEGH u. M.V.TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 487

44) K.HAYASHI u. K.OUCHI, Misc.Repts.Research Inst.Nat.Resources (Japan) 11, 41 (1948). Wir danken den beiden Autoren für die freundliche Überlassung von Vergleichssubstanz.

Glykosid B. Es zeigte vielmehr in mancher Hinsicht die gleichen Eigenschaften wie Rutin, obwohl wir nach der mit 1/2 mg durchgeführten Hydrolyse keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein von R h a m n o s e finden konnten.

Der Schmelzpunkt des Meratins (180°C) stimmt nach den Angaben von C. H. ICE und S. H. WENDER⁴⁵⁾ mit dem Schmelzpunkt eines von den beiden Autoren aus Vaccinium Myrtillus isolierten Quercetin-3-diglukosids überein, das identisch mit Meratin sein soll. Dieser Schmelzpunkt stimmt jedoch nicht mit dem unseres Glykosids überein (Fp : 193°C).

Unsere Syntheseprodukte waren papierchromatographisch ebenfalls nicht mit Meratin identisch. Die Synthese des Gentiobiosids wurde nicht weiterverfolgt, deshalb konnte hiermit nicht verglichen werden.

Es handelte sich also bei der von uns isolierten Substanz um ein n e u e s F l a v o n o l g l y k o s i d, dem wir, da es aus der Kartoffelsorte Carmen gewonnen werden konnte, den Namen C a r m e n o s i d geben.

IX. Zusammenfassung

Aus den Blättern der Kartoffelsorte Carmen wurden drei Flavonolglykoside isoliert bzw. angereichert.

Es konnte bewiesen werden, daß einer dieser Farbstoffe mit Rutin identisch war.

Ein zweites Glykosid ist vermutlich ein Quercetintrisaccharid, dessen Zuckeranteil Glukose und Rhamnose darstellen.

Die letzte der isolierten Substanzen identifizierten wir durch Synthese von Vergleichssubstanzen und mit Hilfe eines papierelektrophoretischen Trennungsverfahrens für Disaccharide als Quercetin-3-(β)-sophorosid.

Die Aufklärung der Zuckerkomponente geschah derart, daß bei r e l a t i v n i e d r i g e m p_{H} - W e r t und

45) C. H. ICE u. S. H. WENDER, J.Amer.chem.Soc. 75, 50 (1953)

unter dem Einfluß einer niederen Spannung die in Frage kommenden Zucker papierelektrophoretisch in zwei Gruppen getrennt werden konnten. Aus der Gruppe, der der fragliche Zucker angehören mußte, schieden wir die Maltose und die Cellobiose nach Vergleich mit den entsprechenden synthetisch erhaltenen Glykosiden aus. Erhärten konnten wir den Befund, daß es sich um Sophorose handelt, durch papierchromatographischen Vergleich mit authentischer Sophorose.

B. Neue Methoden der chromatographischen Adsorptions- analyse an Kunststoffpulvern

Im Verlaufe dieser Arbeit bedienten wir uns einiger methodischer Neuerungen, deren endgültige Ausarbeitung jedoch erst anschließend weiterverfolgt werden konnte.

Diese Verfahren, die sich hauptsächlich mit der Dünnschichtchromatographie pflanzlicher Inhaltsstoffe und der Gewinnung von Kunststoffen auf Caprolactambasis für chromatographische Zwecke in besonders geeigneter Form beschäftigen, sind in dem nun folgenden Teil dieser Arbeit beschrieben.

I. Problemstellung

Ziel der nachfolgend beschriebenen Versuche war es, eine Methode zu finden, die erlaubt, chromatographische Untersuchungen in kürzester Zeit und mit geringem materiellen und apparativen Aufwand durchzuführen. Wir verwandten unsere Mühe ausschließlich auf eine Weiterentwicklung des bewährten Verfahrens der Adsorption an P o l y a m i d .

Die Auftrennung von Substanzgemischen an Perlonsäulen in absteigender Chromatographie hatte sich allgemein gut eingeführt und in einer Reihe von Arbeiten zu Erfolgen geführt⁴⁶⁻⁴⁸). Nicht bekannt war bis jetzt jedoch eine Verwendung dieser Kunststoffe für die Zwecke der Dünnschichtchromatographie.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, daß sich genannte Materialien vorzüglich für derartige Trennungen eignen. Sie bieten darüber hinaus den Vorteil, daß die Chromatographie in sehr kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Besonders bewährt sich die Methode also in Fällen, in denen es darauf ankommt, Fraktionen eines zu trennenden Gemisches rasch zu untersuchen und auf Anwesenheit und Reinheit der gesuchten Substanzen zu

46) V. CARPELLI, A. M. LIQUORI u. A. MELE, Nature (London) 176, 70 (1955)

47) W. GLADSTADT, H. ENDRES, W. PAUCKNER u. H. MATHES, Chem. Ber. 90, 1114 (1957)

48) L. HÖRMANN, H. WAGNER u. W. LEEB, Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

prüfen. Daneben gestattet sie Identitätsprüfungen von Pflanzenextrakten, Tinkturen und deren Zubereitungen durch Vergleich mit authentischem Material, bzw. Testsubstanzen in rascher Weise, auch ohne die Anschaffung kostspieliger Chromatographierkammern. Ein weiterer Vorteil dieser Dünnschichtchromatographie auf Kunststoff ist die Möglichkeit, hiermit geeignete Lösungsmittelsysteme für in Frage kommende, quantitative Trennungen auf Polyamidsäulen zu finden.

Wir versuchten ferner, die Methode in quantitativer Hinsicht auszuwerten, indem wir an Polyamidsäulen aufsteigend chromatographierten. Diese Versuche, die jedoch nur in geringem Umfang durchgeführt wurden, führten in einem Fall zu einem schönen Erfolg. Ein wesentlicher Vorteil ist in der Schnelligkeit des Verfahrens zu sehen. Auch sind die einzelnen substanzhaltigen Säulenabschnitte weniger durch indifferente Extraktivstoffe, die bei absteigender Chromatographie rein mechanisch durch das Füllgut gespült werden, verunreinigt.

II. Dünnschichtchromatographie von Pflanzeninhaltsstoffen auf Kunststoffbelägen

Die Dünnschichtchromatographie, deren Anfänge auf die Arbeiten von J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER und G. J. KELLER⁴⁹⁾ zurückgehen, erfolgte ursprünglich auf schmalen Streifen, den "chromatostrips". R. H. REITSMA⁵⁰⁾ brachte 1954 eine Neuerung durch die Einführung breiterer Platten. In dieser Form wird heute hauptsächlich die Dünnschichtchromatographie betrieben. Das Anwendungsgebiet war vorher auf lipophile Substanzen, wie z. B. ätherische Öle⁵⁰⁻⁵⁵⁾ beschränkt. Auch Substanzen, deren

49) J.G.KIRCHNER, J.M.MILLER u. G.J.KELLER, Analytic.Chem. 23, 420 (1951)

50) R.H.REITSMA, Analytic.Chem. 24, 960 (1954); J.Amer.pharmaco. Assoc.,sci.Edit. 43, 414 (1954)

51) J.M.MILLER u. J.G.KIRCHNER, Analytic.Chem. 26, 2002 (1954)

52) J.M.MILLER u. J.G.KIRCHNER, Analytic.Chem. 24, 1480 (1952)

53) J.M.MILLER u. J.G.KIRCHNER, Analytic.Chem. 23, 428 (1951)

54) J.G.KIRCHNER u. J.M.MILLER, Ind.Engng.Chem. 44, 318 (1952)

55) J.G.KIRCHNER u. J.M.MILLER u. R.G.RICE, Agric.Food Chem. 2, 1031 (1954)

Adsorption an Erdalkali, das dem bisher verwendeten Silicagel in Form von Calciumsulfat als Bindemittel zugesetzt war, infolge Chelatkomplexbildung sehr stark ist, konnten auf diesem Material nicht getrennt werden. Z. B. erhielten wir bei dem Versuch, Flavonolglykoside, die als höhermolekulare Phenole mit Erdalkali ebenfalls unter Komplexbildung reagieren, auf "Kieselgel G" zu trennen, kein befriedigendes Ergebnis.

Wir trachteten nun, das bisher übliche Silicagel (in Deutschland "Kieselgel G" MERCK, Darmstadt, gebräuchlich) durch andere Adsorbentien zu ersetzen. Käufliche Polyamidpulver erwiesen sich als ungeeignet, da deren Korngröße zu grob war. Dies bewirkte sowohl eine geringere Haftfähigkeit an der Glasplatte als auch eine geringere Adsorptionskraft. Ganz allgemein konnten wir in einer Reihe von Versuchen feststellen, daß die adsorptiven Eigenschaften von Polyamiden aller Art hauptsächlich von der Korngröße und erst in zweiter Hinsicht von der chemischen Struktur des Materials bestimmt werden. Aus diesem Grund bereiteten wir uns ein äußerst feinkörniges Kunststoffpulver, dessen Adsorptionskraft es gestattet, Substanzgemische auf einer nur 17 cm langen Laufstrecke ebenso sauber zu trennen, wie in absteigender Papierchromatographie auf einer 50 cm langen Strecke.

1. Trennungen auf Ultramid BMK

Wir begannen unsere Versuche auf Platten, die unter Verwendung des Polyamids "Ultramid BMK 228" der Firma BASF, Ludwigshafen, präpariert worden waren. Es zeigte sich, daß die Schicht, die durch Aufgießen einer milchigen, methanolischen Suspension von Ultramid erhalten wurde, beim Trocknen feine Risse und Sprünge erhielt, die umso breiter auftraten, je dicker der Polyamidbelag beschaffen war. Nachdem es uns schließlich gelang, durch starkes Verdünnen der Suspension eine zusammenhängende Fläche zu schaffen, stellte sich nach dem Entwickeln der Chromatogramme heraus, daß die Auftrennung der Komponenten nur in geringem Maße stattgefunden hatte. Außerdem waren die Flecken unscharf und unregelmäßig in die Breite verlaufen. Einen weiteren Nachteil beobachteten wir beim nachfol-

genden Konservieren der Chromatogramme (siehe S. 37), die im Laufe dieses Prozesses transparent wurden und somit die Erkennung der Flecken stark erschwerten.

Wir führten die negativen Ergebnisse darauf zurück, daß der Härtegrad dieses Materials zu gering ist. Dadurch können bei der Fällung nur flockige Produkte erhalten werden, die zu käsigem Zusammenballen neigen.

2. Trennungen auf Durethan BK 31 F (Bayer)

Dieser Kunststoff, der ebenfalls in sehr feiner Verteilung erhalten werden konnte, entsprach in jeder Hinsicht den gestellten Anforderungen. Er lieferte bei der Fällung im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Polyamid keinen flockigen, sondern einen körnigen Niederschlag. Wir führten dies auf die größere Härte des Materials zurück. Ebenso brauchbar ist die Type BK 40 F, die von noch größerer Viskosität ist. Die Durethantypen bilden auf der Glasplatte einen dünnen, undurchsichtigen Belag aus, sie zeigen eine gute Trennfähigkeit bei verhältnismäßig kurzer Laufzeit. Außerdem behalten die Chromatogramme nach dem Konservieren ihre weiße Farbe bei.

Es wurde eine Reihe von Möglichkeiten in Betracht gezogen, um den Kunststoff in gleichmäßiger Verteilung aufzubringen. Die Methode von E. STAHL⁵⁶⁾ erkannten wir nach einem Vorversuch für unsere Zwecke als unbrauchbar, da sie eine verhältnismäßig dicke, teigige Suspension fordert. Dies hätte zur Folge, daß die Schicht zu dick würde, um auch im Falle des gegenüber Ultramid einfacher zu handhabenden Durethans die Ausbildung von Rissen zu vermeiden. Außerdem ist der materielle Aufwand für Gerätschaften zu groß, um dem Verfahren auch in kleineren Betrieben, z.B. Apothekenlaboratorien, eine praktische Bedeutung geben zu können. Es gelang uns, durch einfaches Aufgießen eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten. Nach ergebnislosen Versuchen einer Anschlammung mit Wasser und Zusatz von Stärkekleister als Bindemittel kamen wir zu dem Resultat, daß eine

56) E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)

Suspendierung in Äthylacetat und Zusatz von SUBITOGEN 2N^{*)})
die gleichmäßigsten Platten hervorbrachte.

Die Trennfähigkeit der Durethanschicht war überraschend gut und stand der von Papier nicht nach. Scharf gezeichnete Flecken erlaubten auch an Stellen, wo sonst Überlagerungen auftraten, eine deutliche Unterscheidung. Diese Tatsache ist umso bemerkenswerter, als die Entwicklung der Chromatogramme bereits nach 45 Minuten abgeschlossen war (Entwicklungsdauer auf Ultramid BMK 228 : 6 bis 7 Stunden).

Wir chromatographierten nach dieser Methode wäßrige Extrakte aus Kartoffelblättern und -blättern und bemerkten keine Veränderung der R_F -Werte von Inhaltsstoffen gegenüber isolierten Reinstoffen.

Ferner ermöglichte uns das Verfahren die Identitätsprüfung anthrachinonhaltiger Auszüge, wie z.B. Extractum Rhei, Extr. Frangulae, Extr. Cascarae sagradae und Extr. Aloes.

3. Bereitung des Kunststoffpulvers

L. HÖRHAMMER und H. WAGNER⁵⁷⁾ führen in einer Abhandlung über Polyamidchromatographie ein Verfahren zur Gewinnung von Perlompulver aus grobem Material an. Dieses Verfahren stammt von P. Schlack, dem Erfinder des Perlons. Es erfordert jedoch einen zu großen apparativen Aufwand und liefert außerdem nur ein Material von verhältnismäßig grobem Korn. Diese Korngröße, die wir auch bei den von der Industrie gelieferten Präparaten finden, war für unsere Zwecke nicht geeignet.

Außerdem suchten wir eine Möglichkeit, die es gestattet, ein Produkt herzustellen, das arm an niedermolekularen, wasser- und alkohollöslichen Bestandteilen ist.

Wir modifizierten nun das Schlack'sche Verfahren etwas und fällten die säurelöslichen Kunststoffe erst nach Verdünnen mit niederen Alkoholen. Beim langsamen Einrühren von Wasser fielen die Polymerisate je nach

57) L. HÖRHAMMER u. H. WAGNER, Pharmaz.Ztg.-Nachr. 31, 783 (1959)

*) ANORGANA GMBH, Burghausen.

Art des verwendeten Materials und je nach Art der Fällung als feinflockiger oder auch sehr feinkörniger Niederschlag aus. Der Feinheitsgrad des Pulvers läßt sich durch zweierlei Einflüsse variieren:

- 1) durch Temperatur,
- 2) durch die Menge des zugefügten Alkohols.

Zum Auflösen verwendeten wir die technische Salzsäure des Handels; ebenso gut eignete sich Eisessig oder Ameisensäure. Als organisches Lösungsmittel diente uns Methanol, bzw. abdestilliertes oder als Waschflüssigkeit von vorangegangenen Fällungen benütztes Methanol. Aceton, das ebenfalls mit Wasser mischbar ist, ist ungeeignet, da es eine Fällung hervorruft.

Entscheidend für die Beschaffenheit des Produkts ist die Art, in der die Fällung mit Wasser vonstatten geht. Das Präparat wird dann am feinkörnigsten, wenn viel Methanol zugesetzt worden war, bzw. wenn die auf 35° C erwärmte Mischung nur mit so viel Wasser verdünnt wird, bis eine Trübung eintritt und die Fällung beim Abkühlen von selbst erfolgt.

Ein weiterer Unterschied bestand noch in der Behandlungsweise der beiden untersuchten Kunststoffe. Um einen feinflockigen Niederschlag von Ultramid BMK 228 zu erhalten, benötigten wir wesentlich mehr Alkohol, als im Falle des Durethans. Außerdem unterschieden sich die beiden Substanzen, wie schon erwähnt, in ihrer äußeren Beschaffenheit. Ultramid lieferte stets flockige Produkte, die sich nach dem Aufgießen auf die Glasplatten kösig zusammenballten, während Durethan als körniger, allerdings äußerst feinkörniger Niederschlag zu erhalten war.

Die Verwendungszwecke unserer so hergestellten Kunststoffpulver waren verschieden.

Ultramidpulver der genannten Charge bereiteten wir uns für säulenchromatographische Zwecke, wobei wir durch mehrmaliges Fällen und Wiederauflösen Substanzen erhielten, die arm an niedermolekularen Bestandteilen waren und außerdem eine bedeutend größere Oberfläche und, damit verbunden, größere Adsorptionskraft besaßen als die Präparate des Handels.

Das Durethanpulver benützten wir ebenfalls für die Säulenchromatographie. Den Hauptverwendungszweck bildete jedoch die Dünnschichtchromatographie und nicht zuletzt die aufsteigende Chromatographie in Röhren aus Polyäthylenoxyd.

4. Wahl des Lösungsmittels für die Entwicklung von Dünnschichtchromatogrammen

Als Lösungsmittel eignete sich wasserhaltiges, essigsäures Methanol sehr gut. Durch Änderung des Wassergehalts schafften wir uns die Möglichkeit, einzelne R_F -Bereiche herauszugreifen und auseinanderzuziehen. Die Form und Lage der Flecke ließ erkennen, daß die adsorptiven Eigenschaften des Durethans umso stärker wirksam wurden, je wäßriger das Laufmittel war. Z. B. zeigte Rutin in wäßrigem Milieu geringeren R_F -Wert und stärkere Schwanzbildung als bei Verwendung von hochprozentigem Alkohol als Entwicklungsflüssigkeit.

Im letzten Falle bildeten die Flecke, die für die Verteilungschromatographie charakteristische runde Form aus, während sich im ersten Fall eine typische Granaten- oder auch Kometenform beobachten ließ. Außerdem war die Laufhöhe der Substanz, wie dies auch von der Adsorptionschromatographie auf Papier mit hydrophilen Laufmitteln bekannt ist, stark konzentrationsabhängig.

Substanzen, die auf dem Papier in organischen Lösungsmittelsystemen (z. B. Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser oder Butanol-Eisessig-Wasser) niedere R_F -Werte besaßen, verhielten sich auf Durethan gerade umgekehrt. Wir wählten deshalb für die Chromatographie von Flavonolglykosiden, deren Wasserlöslichkeit besser als die des Rutins war, ein System, das mehr Wasser enthielt. Die Chromatographie von sehr hydrophoben Substanzen, z.B. von Flavonaglykonen, erwies sich mit dem von uns verwendeten System als reine Adsorptionschromatographie. Andere Systeme wie Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser und Butanol-Eisessig-Wasser sind nicht versucht worden, doch ist anzunehmen, daß auch hiermit eine Verteilungschromatographie möglich ist. Das System Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser fand lediglich

einmal Anwendung für die Trennung von Glykosiden. Der Erfolg war aber nicht zufriedenstellend.

5. Konservierung von Dünnschichtchromatogrammen

Bisher war es nicht möglich, entwickelte, besprühte Chromatogramme zu konservieren, es sei denn durch Pausen oder Photographieren. Mit Hilfe des Kunststoffes SUBITOGEN 2N und 2H gelang es, die empfindlichen Beläge, gleich ob es sich um Kieselgel oder Durethan handelte, in eine dünne Folie von ausreichender Elastizität aufzunehmen. Der Kunststoff, der in dickflüssiger Form in den Handel kommt, läßt sich mit einigen organischen Lösungsmitteln verdünnen und trocknet nach dem Übergießen der Platten rasch ab. Das Lösungsmittel und die Konzentration der Subitogenlösung müssen für Kieselgelchromatogramme und Durethanchromatogramme verschieden gewählt werden. Auch das Ablösen von der Platte erfolgte in verschiedener Weise; es kann in jedem Fall durch Silikonisieren der blanken Platten erleichtert werden. Nähere Einzelheiten im Hinblick auf die angewandte Arbeitstechnik sind dem experimentellen Teil dieser Arbeit zu entnehmen.

III. Dünnschichtchromatographie von Zuckern auf Kieselgel G

Im Verlaufe dieser Arbeit war es sehr oft wünschenswert, einen chromatographischen Nachweis der Zucker direkt und schnell aus der Hydrolyseflüssigkeit durchzuführen. Wir prüften deshalb die Methode der Dünnschichtchromatographie auf ihre Trennfähigkeit für Mono- und Disaccharide.

Es hat sich stets gezeigt, daß Zucker, die aus saurer Lösung aufgetragen wurden, bemerkenswerte R_f -Depressionen gegenüber Testsubstanzen aus neutraler Lösung aufweisen. Diese R_f -Depressionen traten in dem von uns entwickelten System n-Butanol-Eisessig-Wasser (70+30+5) nicht mehr auf.

Außerdem ist darauf zu achten, daß die Hydrolyse mit einer flüchtigen Säure durchgeführt wird, um eine Zerstörung des Zuckers beim Eintrocknen zu vermeiden.

Die Methode hat sich für die schnelle Trennung von Monosacchariden bewährt; der Trenneffekt für Disaccharide ist ungenügend.

Im folgenden sind einige R_f -Werte angegeben, die wir nach diesem Verfahren erhalten haben. Die R_f -Werte sind auf Rhamnose als Testsubstanz abgestimmt, die stets mit aufgetragen werden mußte.

Die Berechnung ergibt sich aus folgendem Schema:

$$R_f \text{ corr. Subst.} = \frac{R_f \text{ Stand. Rhamnose} \cdot R_f \text{ gem. Subst.}}{R_f \text{ Test-Rhamnose}}$$

T a b e l l e 4

Zucker	R_f -Wert
Rhamnose	0,58
Xylose	0,51
Arabinose	0,41
Glukose	0,39
Galaktose	0,30
Maltose	0,16

IV. Ein neues Trennverfahren auf Ultramid- bzw. Durethan- säulen in aufsteigender Arbeitsweise

Die Trennergebnisse, die wir auf unseren Dünnschichtchromatogrammen erhielten, ermutigten uns zu dem Versuch, die Methode auch quantitativ zu gestalten. Wir fertigten uns Röhren aus Polyäthylenoxyd mit durchlöcherntem Boden an und entwickelten aufsteigend in Lösungsmitteln, die wir vorher durch Plattenchromatographie auf ihre Eignung untersucht hatten. Es

gelang uns auf diese Weise ein Quercetinligosaccharid, an dessen Isolierung vorher ein halbes Jahr vergeblich gearbeitet worden war, in einem Arbeitsgang chromatographisch rein zu erhalten. Die Dauer der Isolierung aus einem wäßrigen Gesamtextrakt betrug einschließlich der zur Herstellung und zum Füllen der Säule benötigten Zeit einen Tag.

Das Kunststoffmaterial soll möglichst feinkörnig sein. Es saugt, trocken eingefüllt, die Entwicklungsflüssigkeit auf Grund der Kapillarwirkung in sich auf. Außerdem ist es wichtig, daß die Kapazität der Säule nicht überschritten wird und daß die Säule nahtlos ist.

Der Vorteil dieser Trennmethode, die aus zeitlichen Gründen nur in beschränktem Umfang durchgeführt werden konnte, liegt in der Schnelligkeit des Verfahrens und in der Tatsache begründet, daß indifferente Ballaststoffe nicht mechanisch durchgespült werden können. Der Lösungsmittelverbrauch ist, abgesehen von der zum Eluieren der ausgeschnittenen Zone benötigten Menge, sehr gering.

Experimenteller Teil

Methodische Einzelheiten zu Teil A

I. Papierchromatographie

Wir chromatographierten in der Hauptsache absteigend unter Verwendung des Papiers Nr. 2043b Gl. der Firma Schleicher und Schüll, Dassel. Das Entwickeln der Chromatogramme erfolgte in großen Glaskammern, die vor dem Arbeiten mit 2phasigen Lösungsmitteln mit den Dämpfen der Unterphase, bei Verwendung 1phasiger Lösungsmittel mit deren Dämpfen selbst gesättigt worden waren.

a) Lösungsmittel

Wir bedienten uns folgender Fließmittel:

- 1) Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (ÄAW) (10+2+3) Oberphase
- 2) Butanol-Eisessig-Wasser (BEW) (4+1+5) Oberphase
- 3) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (IAW) (2+5+5) einphasig
- 4) Isopropanol 60%ig
- 5) Äthylacetat, wassergesättigt
- 6) Pyridin-Äthylacetat-Wasser (PÄW) (1+2+2) Oberphase
- 7) sek. Butanol-Eisessig-Wasser (s.BEW) (5+3+2) einphasig.

Die Systeme 1 und 2 eigneten sich besonders für die Trennung von Flavonolglykosiden des mittleren R_f -Bereichs zwischen 0,30 und 0,60. Wir verwendeten bevorzugt das System 1, das sich durch schnellere Laufzeit (11 - 12 Std.) auszeichnete.

System 3 zogen wir zur Unterscheidung der Aglykone heran. Daneben trennte dieses System aber auch vorzüglich die untersuchten Quercetin-3-diglykoside und ermöglichte die Unterscheidungen: Meratin - Carmenosid, Quercetincellobiosid, Quercetinmaltosid und Carmenosid - Quercetincellobiosid, Quercetinmaltosid (siehe auch Tabelle 2, S. 24).

Die Systeme 4 und 5 ließen eine weitere Unterscheidung zwischen den beiden synthetisierten Substanzen zu.

Das Fließmittel 6 verwendeten wir für die Trennung der Monosaccharide.

System 7 ermöglichte eine einwandfreie Unterscheidung der Disaccharide: Cellobiose, Maltose, Gentiobiose, Sophorose und Laminaribiose

b) Sprühreagenzien

- 1) Basische Bleiacetatlösung (Liqu.Plumbi subacetic, DAB 6⁵⁸⁾);
- 2) 5%ige Aluminiumsulfatlösung⁵⁹⁾ oder Liqu.Alumin.acetic., DAB 6;
- 3) Anilinphthalatlösung⁶⁰⁾:
 Anilin 0,63 g
 o-Phthalsäure 1,66 g
 wassergesättigtes n-Butanol ad 100,0 ml;
- 4) ammoniakalische Silbernitratlösung:
 0,1 n AgNO₃ 1 Vol. festes NaOH zufügen, so daß
 5 n NH₃-Lösung 1 vol. eine 1 n Natronlauge entsteht.

Die Reagenzien 1 und 2 dienten zur Erkennung und Sichtbarmachung von Quercetin und Quercetin-3-glykosiden.

T a b e l l e 5

	vor dem Besprühen	besprüht mit Al ⁺⁺⁺	besprüht mit Pb ⁺⁺
Quercetin	gelb	gelbgrün	orange
"-3-Glykos.	braun	gelbgrün	orange

Reagenz 3 ergab mit reduzierenden Zuckern gefärbte Flecke.

Wir besprühten die getrockneten Chromatogramme und brachten sie noch feucht für 10 Min. in einen auf 110° C vorge-

58) T. RAO u. T. R. SESHADRI, Proc.Indian Acad.Sci. 171, 119 (1943); siehe auch: H. F. LINSKENS "Papierchromatographie in der Botanik", S. 206, Berlin-Gött.-Heidelbg. 1955

59) R. PARIS, Bull.Soc.Chim.biol. 34, 767 (1952)

60) S.M. PARTRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)

heizten Trockenschrank. Pentosen und Methylpentosen lieferten rotbraun gefärbte Flecke, Aldohexosen braun gefärbte Flecke.

Das Reagenz 4 cignete sich ebenso wie Reagenz 3 zur Erkennung von Zuckern. Wir benützten es in allen Fällen, wo die Natur des Zuckers bekannt war und es nur darum ging, den Flecken zu lokalisieren.

II. Prüfung von 25 Kartoffelsorten auf flavonische

Bestandteile

Das frische, im Juli gesammelte Kartoffelkraut trockneten wir an der Luft und trennten anschließend in Blätter und Stengel.

Die Mazeration erfolgte durch Ausziehen von je 10 g des getrockneten Krautes mit 20 g Methanol bei Zimmertemperatur während einer Dauer von 10 Tagen. Im Falle der getrockneten und pulverisierten Knollen, die wir aber nur stichprobenartig und mit negativem Erfolg untersuchten, mazerierten wir 20 Tage.

Von diesen Mazeraten trugen wir 0,03 ml auf Papier auf und entwickelten in ÄAW.

III. Isolierung der natürlichen Glykoside aus den Blättern

von Solanum tuberosum var. "Carmen"

Wir extrahierten 1,5 kg lufttrockene Blätter erschöpfend im Soxhlet und benötigten hierzu 10 l Methanol. Diesen Auszug engten wir bis zur Sirupkonsistenz unter vermindertem Druck ein, mazerierten in einer weiten Abdampfschale mit heißem Wasser und filtrierten vom ausgeschiedenen Chlorophyll ab. Von den erhaltenen 500 ml des wäßrigen Extraktes verdünnten wir 100 ml mit Wasser auf 5 l und schickten diese Lösung über eine aktivierte Permutit-C-Säule.

Diese Säule von 1,2 m Länge und 6 cm lichter Weite wurde in folgender Weise für die Adsorption vorbereitet: Wir füllten 1,5 l gequollenes Permutit C ein, regenerierten mit 2%iger Salzsäure und wuschen schließlich mit destilliertem Wasser neutral.

Unser wäßriger Pflanzenextrakt hatte die Säule nach 50 Min. passiert. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser bis zur Farblosigkeit eluierten wir die adsorbierten Flavone mit 5 l Methanol und engten die Lösung ein. Es zeigte sich, daß wir bei der Behandlung in angegebener Weise die Kapazität des Permutits überschritten hatten. Infolgedessen wiederholten wir nach erneutem Regenerieren den Vorgang der Adsorption und gewannen eine weitere methanolische Flavonfraktion, die wir mit der zuerst gewonnenen vereinigten.

In diesem Permutit-Eluat fanden sich die flavonolischen Bestandteile stark angereichert.

Um nun eine weitere Anreicherung, besonders des Rutins und des Carmenosids, zu bekommen, führten wir den Methanol-extrakt abermals in eine wäßrige Lösung über, die wir, auf p_H 7-8 gebracht, in einem Perforator mit wassergesättigtem Äthylacetat 3 Tage lang auszogen. Nach dem Abdunsten des Äthylacetats nahmen wir mit 100 ml Methanol auf und verwendeten 25 ml dieser Lösung zur weiteren Trennung des Rutins und des Carmenosids auf einer Zellolosesäule. Den wäßrigen Rückstand der Äthylacetatperforation bewahrten wir im Kühlschrank auf für die Gewinnung des Quercetinoligosaccharids, das in dieser Fraktion angereichert war.

1. Verteilungschromatographische Auftrennung zweier Glykoside auf einer Zellolosesäule^{*)}

Wir bereiteten uns eine 1,2 m lange, mit Zellulose gefüllte Säule mit einem Durchmesser von 6 cm. Der Boden der Säule war bedeckt von einer dichten Lage Glaswolle. Das Zellolosepulver ließen wir 2 Std. in wassergesättigtem Äthyl-

^{*)} Zellulosepulver der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel, Nr. 125a für Säulenchromatographie.

acetat quellen und füllten es portionsweise bei geöffnetem Hahn in die Säule. Es mußte stets darauf geachtet werden, daß über der sich absetzenden Zellulosemasse Lösungsmittel vorhanden war, um auf jeden Fall ein Eindringen von Luft in den Säulenkörper zu vermeiden. Dies hätte eine wesentliche Verringerung der Kapazität zur Folge gehabt. Nach jeder Zugabe von Zellulose drückten wir nach dem Absitzen die Masse mit einem Glasstopfer etwas an. Besonderen Wert legten wir nach der 7. und letzten Portion darauf, daß sich eine glatte und feste Oberfläche ausbildete. Dies erreichten wir durch vorsichtiges Ablaufenlassen des Lösungsmittels bis zur Oberfläche, Andrücken und mehrmalige Wiederholung des Vorganges.

Nun tränkten wir 5 g Zellulosepulver mit den 25 ml methanolischer Anreicherung der zwei zu trennenden Glykoside, trockneten unter Verwendung eines Oberflächenverdampfers und schlämmten das Trockenpulver ebenfalls mit wassergesättigtem Äthylacetat an. Den Brei brachten wir vorsichtig auf die vorbereitete Säule und eluierten nun mit wasserhaltigem Äthylacetat, das wir aus einem aufgesetzten 5 l Tropftrichter zufließen ließen. Wir verwandten nicht vollständig mit Wasser abgesättigtes Äthylacetat, sondern bereiteten uns ein Lösungsmittel, das aus 3 Teilen wassergesättigtem Äthylacetat und 1 Teil reinem Äthylacetat bestand. Damit verhinderten wir eine durch Temperaturschwankungen mögliche Abscheidung von Wasser in Tröpfchenform innerhalb der Säulenfüllung, die die weitere Trennung unmöglich gemacht hätte.

Nachdem die Säule 25 Tage bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tr./sec. gelaufen war, erschien in der ersten Fraktion die Substanz, die sich bei späterer Aufklärung als Rutin erwies. Die nächste Fraktion brachte das Carmenosid, während 5 cm unter der ursprünglichen Füllhöhe Quercetinoligosaccharid zurückblieb. Diese Zone schnitten wir aus der mittels Wasserdruck herausgepreßten Säulenfüllung heraus, eluierten nach dem Trocknen mit Methanol und vereinigten die Lösung mit der von der Äthylacetatperforation übriggebliebenen Phase.

Die Zellulosefraktionen 1 und 2 engten wir nun nach Passieren einer Glasfritte G1 bis zur Trockene im Vakuum ein, nahmen mit 95%igem Methanol auf und kristallisierten aus silikonisierten Bechergläsern.

2. Gewinnung einer papierchromatographisch reinen Lösung eines Quercetintri- oder -tetrasaccharids auf einer Ultramidsäule*)

Der wäßrige Anteil der Äthylacetatperforation und das methanolische Eluat der ausgeschnittenen Zone aus der Zellulosesäule wurden auf 10 ml eingengt und auf eine vorbereitete Ultramidsäule gebracht.

Wir verwendeten eine für die Trennung auf Ultramid verhältnismäßig weite Säule mit einem Durchmesser von 5 cm bei einer Füllhöhe von 50 cm. Bei derartig weiten Säulen ist in arbeitstechnischer Hinsicht besonders große Sorgfalt geboten. Damit die Füllung auch im unteren Teil der Säule gleichmäßig abschloß, fertigten wir uns mit Hilfe eines heißen elektrischen Bügeleisens aus Glaswolle gepreßte Platten, von denen wir eine für den unteren Abschluß der Füllung benützten. Diese erwiesen sich besser als Sinterplatten, da bei letzteren leicht eine Verstopfung der Poren eintreten kann. Das Polyamid füllten wir nach 24stündigem Quellen in Wasser in wäßriger Suspension ein und sorgten auf gleiche Weise wie bei Zellulose beschrieben für die Ausbildung einer glatten Oberfläche. Das Auftragen der Substanzlösung geschah derart, daß wir diese auf eine der Ultramidoberfläche aufliegende Glaswolleplatte, die sehr vorsichtig aufgelegt worden war, auftropfen ließen. Damit verhinderten wir eine Verletzung der Oberfläche durch aufschlagende Tropfen oder auch Beschädigung durch am Rand herunterlaufende Flüssigkeit.

Jetzt konnten wir mit Wasser eluieren. Um eine scharfe Zone zu bekommen, wählten wir eine geringe Tropfgeschwindigkeit (20 Tropfen/Min.). Die Säule gab als erste Substanz das Quercetinoligosaccharid frei, das wir durch Abdampfen

*) Ultramid BMK 228 der Fa. BASF, Ludwigshafen, Siebgröße 0,2 mm.

des Wassers in einem Vakuumrotationsverdampfer als gelbbraunen Belag an der Gefäßwandung erhielten.

Es sei an dieser Stelle hinzugefügt, daß das am Ende vorliegender Arbeit mit Hilfe aufsteigender Chromatographie an Durethansäulen aus dem wäßrigen Gesamtextrakt gewonnene Produkt einen höheren Reinheitsgrad in Bezug auf papierchromatographisch nicht erkennbare Beimengungen aufwies, als diese Substanz.

IV. Zur Synthese der Quercetindisaccharide

1. Gewinnung der Quercetinalkalisalze

Wir bereiteten uns 500 ml einer gesättigten Lösung von Quercetin in absolutem Methanol und fügten dieser 10 g Essigsäure hinzu. Aus der nun zugesetzten gesättigten alkoholischen Kalilauge bildete sich primär mit der Essigsäure Kaliumacetat, das bei weiterem Alkalisieren der Lösung den p_H bei 8 hielt. Vorsichtshalber führten wir jedoch den Versuch unter ständiger Beobachtung mit einem Potentiometer durch. Wir beendeten die Fällung bei Beginn einer Trübung im Reaktionsgemisch, die stets verzögert eintrat. Das Absaugen vom Methanol geschah in Stickstoffatmosphäre, um den Einfluß der Luftkohlendensäure zu verhindern. Wir trockneten die Substanz im Vakuum bei 60° C, ebenfalls unter weitgehender Ausschaltung der Kohlendensäure der Luft.

Eine weitere Möglichkeit suchten wir in der Fällung mit Natrium- und Kaliummethylat, deren Lösung wir uns jeweils frisch bereiteten. Die Ausbeute, die im oben angegebenen Fall 60%, berechnet auf Quercetin, betrug, konnte hierdurch aber nur unwesentlich gesteigert werden.

2. Herstellung der Acetobromzucker

Die in Frage kommenden Disaccharide, Maltose, Cellobiose und Gentiobiose acetobromierten wir auf verschiedene Weise.

Das Grundprinzip dieser Umsetzungen ist jedoch stets das gleiche, deshalb sei an dieser Stelle nur ein Verfahren und zwar das Verfahren nach M. BARCZAI-MATOS und F. KÖRÖSY⁶¹⁾ beschrieben.

Wir mischten 250 ml Acetanhydrit mit 1,5 ml 72%iger HClO_4 und setzten innerhalb 30 Min. zwischen 30 und 40° C 69 g des Disaccharids zu. Nach Zufügen von 15 g rotem Phosphor wurden unter Eiswasserkühlung bei einer Temperatur unter 20° C 30 ml Brom in Anteilen eingetropft und schließlich innerhalb einer halben Stunde 13 ml Wasser. Nach 4stündigem Stehen bei Raumtemperatur nahmen wir das Gemisch in 150 ml Chloroform auf und gossen die Reaktionsmischung allmählich in 1/2 l Wasser. Die Chloroformschicht trennten wir im Scheidetrichter vom Wasser ab, entfernten durch Filtrieren den überschüssigen Phosphor und extrahierten 2mal mit dem gleichen Volumen Eiswasser. Das Waschwasser schüttelten wir 2mal mit 15 ml Chloroform zurück und wuschen anschließend den Rest der Säure mit NaHCO_3 -Lösung aus bis zum p_H 6. Nach dem 1/2stündigen Trocknen mit CaCl_2 in Gegenwart einer geringen Menge Natriumbikarbonat und 2,5 g Tierkohle filtrierten wir und engten im Vakuum bei einer Badtemperatur von 60° C ein. Den Rückstand lösten wir in eigenem Volumen trockenem Äther und kristallisierten aus diesem nach nochmaliger Reinigung mit Tierkohle um.

3. Kondensation von Quercetin-Alkali- und Acetobromzuckern

Im Grundprinzip richteten wir uns nach der Methode von C. H. Ice und S. H. Wender. 0,2 g Quercetinsalz übergossen wir mit 200 ml flüssigem Ammoniak, schüttelten 5 Min. bei Gegenwart von Glasstückchen, um weitgehende Lösung zu erreichen und fügten anschließend 0,8 g Acetobromzucker hinzu. Wir achteten sorgfältig auf absolute Trockenheit des Reaktionsgefäßes, das mit einem Natronkalkrohr verschlossen war. Nun ließen wir bei Raumtemperatur so lange stehen, bis aller Ammoniak verdunstet war und lösten anschließend den

61) M. BARCZAI-MATOS u. F. KÖRÖSY, Nature (London) 165, 369 (1950)

Rückstand in 50 ml Methanol. Nach 24stündigem Stehen filtrierten wir und entfernten das Methanol durch Abdestillieren bei vermindertem Druck.

Nach dem Abdunsten des Ammoniaks entfernten wir sofort sämtliche Ammoniakdämpfe durch Einblasen von Stickstoff, da wir auf diese Weise noch unverändertes Acetylprodukt im Reaktionsrückstand vorliegen hatten. Dieses ließ sich auf einer Magnesolsäule reinigen. Es ist aber nicht möglich, freie Quercetindisaccharide auf Magnesol zu trennen, da deren Adsorption bereits zu stark ist. Anschließend an die säulenchromatographische Reinigung wurde noch nach folgender Methode⁶²⁾ desacetyliert. Wir lösten das Acetylglykosid in der Menge, in der es nach der Säulentrennung angefallen war, in 5 ml kaltem, absolutem Methanol, versetzten mit 0,1 ml 0,1 n NaOCH_3 und stellten 2 Min. auf ein kochendes Wasserbad. Nach Neutralisieren mit Essigsäure reinigten wir über besonders sorgfältig mit heißem Methanol gewaschenem Ultramid.

Gelegentlich verzichteten wir jedoch auf die Herstellung des Acetylglykosids und ließen die Desacetylierung gleich in der nach Abdunsten des Ammoniaks gewonnenen methanolischen Lösung, die immer noch stark alkalisch reagierte, vor sich gehen. Diese methanolische Lösung destillierten wir, wie schon erwähnt, ab, lösten in Wasser und brachten auf p_H 5. Nachdem vom ausgefallenen, nicht umgesetzten Quercetin abfiltriert war, schüttelten wir mit Äther/Äthylacetat (1+1) aus, um die letzten Reste Quercetin zu entfernen. Auf diese Weise gelang es uns, sämtliche, papierchromatographisch im System KAW über dem Glykosid feststellbaren Substanzen zu entfernen. Die anschließende Perforation mit Äthylacetat, das 5% Methanol enthielt, führte zu einer wesentlichen Anreicherung der Diglukoside. Eine endgültige Reinigung der Substanz gelang uns durch säulenchromatographische Trennung auf Ultramid in analoger Weise wie dies bei der Isolierung des Glykosids C bereits beschrieben wurde, nur mit dem Unterschied, daß wir in diesem Falle mit Methanol als mobiler Phase arbeiteten.

62) G. ZEMPLÉN, Ber.dtsch.chem.Ges. 56, 1705 (1923); 59, 1258 (1926); 69, 1827 (1936)

Die Ausbeute betrug 50,3 mg Cellobiosid und etwa 40 mg Maltosid. Das Cellobiosid konnten wir kristallin gewinnen, das Maltosid nur in Form eines gelben Lacks.

Die Substanzen zeigten, ebenso wie die natürlichen isolierten Glykoside sämtliche für Flavonol-3-Glykoside charakteristischen Reaktionen. Den Nachweis, daß es sich tatsächlich um β -glykosidische Bindungen zwischen Aglykon und Zucker handelte, brachten wir durch fermentative Hydrolyse. Die Reaktion sei jedoch an späterer Stelle beschrieben.

Den für die Synthese erforderlichen flüssigen Ammoniak gewannen wir zu Beginn unserer Versuche noch durch Zutropfen von gesättigter Natronlauge zu festem Ammoniumchlorid in der Siedehitze. Die sich entwickelnden, noch stark wasserhaltigen Dämpfe leiteten wir zuerst durch einen Kugelkühler und anschließend durch ein System von Trockengefäßen, die mit festem Ätznatron und Calciumspänen beschickt waren. Die Verflüssigung erfolgte in Kühlfallen, wie sie für die Zwecke der Gefriertrocknung üblich sind. Als Kältemischung genügte Isopropanol, das ständig mit zerschlagenem Kohlensäureeis versetzt wurde. Die zwei seitlichen Schliffansätze der Kühlfalle verschlossen wir mit Natronkalkrohren.

Eine Vereinfachung bot später die Verwendung von käuflichem Ammoniakgas aus Stahlflaschen, das nach Trocknung sofort kondensiert werden konnte.

V. Gewinnung von Gentiobiose, ausgehend von Glukose auf reversionssynthetischem Wege⁶³⁾

Wir bereiteten uns 540 g einer 50%igen Glukoselösung. Mit einem Teil dieser Lösung rieben wir 5,4 g käufliches Süßmandelemulsin an und fügten die Suspension unserem Ansatz zu. Zur Konservierung versetzten wir mit 1 g Toluol und ließen nun 8 Wochen stehen.

63) J. BOURQUELOT u. H. HERISSEY, C.R.hebd.Séances Acad. Sci. 157, 732 (1913)

Die überschüssige Glukose konnte nach Verdünnen dieses Ansatzes auf 3 l Flüssigkeit mit Bäckerhefe vergoren werden. Nach 3 Tagen prüften wir papierchromatographisch auf Glukosefreiheit.

Da keine Glukose mehr gefunden werden konnte, zentriugierten wir von dem Hefeniederschlag ab, filtrierten und erhitzen die Lösung 1/4 Std. auf dem siedenden Wasserbad. Anschließendes Einengen im Vakuumrotationsverdampfer führte zu einem gelbbraunen Sirup, der nach dem Auflösen in Methanol eine weitere flockige Fällung ausschied. Nach dem Abfiltrieren engten wir abermals ein und acetylierten anschließend nach der Liebermann'schen Natriumacetatmethode⁶⁴⁾.

Der Sirup, etwa 20 g, wurde mit 100 ml Essigsäureanhydrit und 10 g frisch geschmolzenem Natriumacetat in einem 300 ml-Kolben unter Schütteln 2 1/2 Std. erhitzt und, nachdem Lösung eingetreten war, noch 3 Std. beiseite gestellt. Dann gossen wir unter Rühren in Eiswasser, zerstampften die Kristallmasse und kristallisierten diese nach dem Absaugen und Neutralwaschen mehrmals aus Alkohol um.

Da der Zucker selbst hergestellt war, prüften wir durch die Bestimmung des Schmelzpunkts des Acetats, ob tatsächlich Gentiobiose nach dem angegebenen Verfahren erhalten werden konnte.

Dazu brauchten wir ein vollkommen schmelzpunktrees Acetat, das wir uns folgendermaßen herstellten:

50 mg Substanz wurden in einem unten zugeschmolzenen Glasröhrchen von 5 mm Weite und 20 cm Länge im heißen Paraffinbad bei Unterdruck erhitzt. Nach einiger Zeit schieden sich 5 mm über der Paraffinoberfläche im Inneren des Röhrchens lange, glänzende Nadeln von Gentiobioseoctaacetat ab, deren Schmelzpunkt nach dem Herausschneiden des betreffenden Glasringes bestimmt werden konnte. Er lag bei 195-196°C und stimmte mit dem Literaturwert für β -Octaacetyl-gentiobiose überein.

64) W. KÖNIGS u. E. KNORR, Ber.dtsch.chem.Ges. 34, 369 (1901) nach einer Vorschrift von E. FISCHER, Ber.dtsch.chem. Ges. 49, 584 (1916)

Außerdem wies sich der gewonnene freie Zucker durch seinen bitteren Geschmack und sein elektrophoretisches Verhalten ebenfalls als Gentiobiose aus.

Für papierchromatographische Zwecke und zur Gewinnung einer Vergleichssubstanz für unsere Elektrophoreseversuche stellten wir aus dem Acetat den reinen freien Zucker durch Umesterung mit Hilfe einer katalytischen Menge Natriummethylat her⁶⁵⁾⁶⁶⁾: Wir lösten 1,0 g Octaacetylgentiobiose in 10 ml kaltem, absolutem Methanol und versetzten mit 0,2 ml einer 0,1 n NaOCH_3 -Lösung, die wir uns durch Auflösen von 0,25 g metallischem Natrium in 100 ml absolutem Methanol selbst bereiteten. Nach 2minütigem Erhitzen auf dem kochenden Wasserbad war die Umsetzung beendet. Nach dem Erkalten neutralisierten wir durch Zusatz von 0,2 ml 0,1 n HCl . Diese Lösung eignete sich für unsere Zwecke, da sich der geringe Salzgehalt von 1% bei den angewandten chromatographischen Verfahren nicht störend bemerkbar machte.

VI. Versuche zur Charakterisierung und Identifizierung der isolierten Flavonolglykoside

1. Papierchromatographie

Von den drei isolierten Substanzen ließ sich lediglich eine einem schon bekannten Anthoxanthin zuordnen. Diese Substanz war identisch mit Rutin.

Der papierchromatographische Vergleich in drei verschiedenen Laufmitteln sowie der dünn-schichtchromatographische Vergleich auf Durethan zeigten vollkommene Übereinstimmung in den R_F -Werten^{*)}.

65) G. ZEMPLÉN u. E. PACSU, Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 1613 (1929)

66) G. ZEMPLÉN, A. GERECs u. Ilona HADACsY, Ber.dtsch.chem. Ges. 69, 1827 (1936)

*) Der angegebenen R_F -Werten ist keine absolute Bedeutung beizumessen. Sie liegen ausnahmslos höher als in der Literatur angegeben, deshalb wurden Schlüsse nur bei gleichartigem Verhalten der Testsubstanzen gezogen.

T a b e l l e 6

System ^{*)}	Rutin, authentisch	Rutin, isoliert
IAW	0,67	0,67
ÄAW	0,53	0,53
BEW	0,62	0,62

Das Carmenosid wies in ÄAW einen R_F -Wert von 0,48 und in IAW einen R_F -Wert von 0,75 auf.

Die letzte der isolierten Substanzen hatte folgende R_F -Werte: ÄAW = 0,18; IAW = 0,80.

2. Schmelzpunkte

Die in dieser Arbeit angegebenen korrigierten Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt. Wir fanden für Rutin: 192-195° C.

Der Schmelzpunkt stimmte mit dem von authentischem Rutin überein. Auch im Mischschmelzpunkt ergab sich keine Depression.

Das Carmenosid schmolz bei 193° C und vergleichsweise das Meratin, ebenfalls ein Quercetindiglukosid, nach den Angaben des Entdeckers bei 179-180° C.

Die dritte isolierte Substanz konnte nicht kristallin erhalten werden.

3. Reduktionstest

Wir versetzten 1 ml einer ungefähr 0,5%igen, methanolischen Lösung der Substanz im Reagenzglas mit 20 mg Magnesiumpulver und fügten anschließend 5 Tropfen 25%ige Salzsäure hinzu.

Wir erhielten in allen Fällen die für Quercetinderivate charakteristische Weinrot-Färbung.

*) Die Bedeutung der Abkürzungen ist auf Seite 40 erklärt.

4. Zirkon-Zitronensäure-Test

Dieser Test gab uns Aufschluß, daß unsere Flavonole sämtlich am C-3 verglykosidiert waren. Das entwickelte Chromatogramm wurde mit einer 2%igen Lösung von Zirkonoxychlorid in Methanol besprüht. Beim sofortigen Betrachten unter der UV-Lampe zeigten die Flecke intensiv gelbe Fluoreszenz. In unserem Fall waren die Fluoreszenzen nach dem anschließenden Besprühen mit 5%iger Zitronensäure gelöscht, traten aber nach Hydrolyse der Substanz mittels heißer Salzsäuredämpfe wieder auf. Diese zweite gelbe Fluoreszenz war jedoch nicht wie im ersten Fall eine Komplexfarbe, sondern die natürliche Farbe des Aglykons.

5. Tauböck-Test

Die Reaktion bewies uns ebenfalls, daß unsere Glykoside C-3-Glykoside sind.

Wir dampften einige ml irgend einer nicht besonders reinen Fraktion oder einer verdünnten Mutterlauge, die von Kristallisationsversuchen herrührte, in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad zur Trockene ein, lösten den Rückstand in 5 ml Aceton, setzten wenige mg gleicher Teile Bor- und Oxalsäure zu und trockneten abermals. Der in Äther gelöste Rückstand verlieh diesem eine gelbe Farbe, bzw. im UV-Licht eine gelbgrüne Fluoreszenz, was auf Anwesenheit einer 4-Keto-3-Oxygruppe hindeutete.

6. UV-absorptionsspektrophotometrische Messungen

Wir führten die Messungen im Zeiß Opton-Spektralphotometer M 4 Q durch. Die Konzentration der untersuchten Lösungen betrug maximal 4 mg%. Gemessen wurde in analysenreinem Methanol bei Verwendung von 1 cm-Quarzküvetten.

Die UV-Maxima der untersuchten Substanzen sind in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 7

Substanz	Max _I	Max _{II}
Rutin, authentisch	258 mμ	357 mμ
Rutin, isoliert	258 mμ	357 mμ
Carmenosid	257 mμ	355 mμ
Cellobiosid	257 mμ	355 mμ
Maltosid	258 mμ	355 mμ
Meratin	255 mμ	356 mμ
Quercetinoligosaccharid	253 mμ	355 mμ

7. Infrarotspektren

Die abgebildeten IR-Spektren (siehe S. 24) wurden nach dem Trocknen im Hochvakuum im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 aufgenommen. Die Konzentration betrug im Falle des Carmenosids 1150 γ/300 mg KBr und im Falle des Quercetin-3-cellobiosids 1400 γ/300 mg KBr.

VII. Hydrolysen

Hydrolysen mit 2%iger Salzsäure

Wir bereiteten uns eine Lösung der Substanz in einer Mischung aus 3 ml Methanol und 7 ml einer 2%igen Salzsäure. Nach 2stündigem Erhitzen unter Rückflußkühlung vertrieben wir das Methanol durch Abdampfen ohne Kühler für die Dauer einer halben Stunde. Nun stellten wir in den Kühltisch, saugten nach 12 Stunden vom ausgefallenen Quercetin ab und schüttelten die wäßrige Phase 5mal mit je 15 ml Äther aus. Der abfiltrierte Niederschlag und das nach dem Abdunsten des Äthers zurückgebliebene Aglykon wurden in Methanol gelöst und mit dieser Lösung die papierchromatographischen und UV-spektrophotometrischen Bestimmungen durchgeführt.

Weitere Hydrolyseversuche sind bei der Beschreibung der Zuckeridentifizierung angeführt.

VIII. Identifizierung der Aglykone

Bei der Gesamthydrolyse des wäßrigen Extrakts erhielten wir nur ein einziges Aglykon, das in seinem Verhalten auf Identität mit Quercetin schließen ließ. Diese Gesamthydrolyse führten wir in der Art durch, daß wir zu 10 ml Extrakt 1 ml 25%ige HCl fügten und 2 Std. auf dem Luftbad über offener Flamme erhitzen. Das Aglykon schied sich aus der Lösung nicht flockig, sondern in harzigen Massen ab und mußte vor den Kristallisationsversuchen über eine Ultramidsäule gereinigt werden. Wir kristallisierten 3mal aus 90%igem Äthylalkohol um und erhielten so eine schmelzpunktne Substanz.

1. Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt wurde nur vom Quercetin, das wir aus dem Gesamthydrolysat erhielten, bestimmt. Er lag bei 299-301°C und stimmte mit dem Literaturwert überein. Auch im Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetin ergab sich keine Depression.

2. Papierchromatographischer Vergleich

Für papierchromatographische Vergleiche, sowie für die übrigen, im folgenden angegebenen Identitätsprüfungen verwandten wir stets Aglykone, die wir aus kristallinen Reinsubstanzen bzw. reinen Lösungen der einzelnen Glykoside gewannen.

Wir gelangten in sämtlichen Fällen nur zu einem Fleck, der sich R_f -mäßig und farblich in nichts von der Testsubstanz unterschied.

T a b e l l e 8

R_f -Wert in:			Farbe:		
KAU	BEW	IAW	unbespr.	mit Al***	mit Pb**
0,84	0,69	0,21	gelb	gelbgrün	orange

3. UV-absorptionsspektrophotometrische Messungen

Die Spektren wurden nach der auf Seite 53 angegebenen Methode aufgenommen. Die zwei Maxima, die bei einer Wellenlänge von 255 und 370 m μ auftraten, stimmten mit den Maxima der Testsubstanz überein.

IX. Identifizierung der Zuckerkomponenten

Totalhydrolysen

Wir lösten 1-2 mg Substanz in 1 ml 2%iger HCl und hydrolysierten 2 Std. über kleiner Flamme im Luftbad. Nachdem das Aglykon durch 12stündiges Stehen im Kühlschrank ausgefallen war, trennten wir von diesem auf einer G3-Fritte. Um wirklich die letzten Reste färbender Substanz zu entfernen, gossen wir die Lösung über eine 1/2 cm hohe Säule aus Magnesol, ebenfalls in der G3-Fritte.

Wichtig war, daß das Magnesol vorher auf der Säule gut mit 2%iger Salzsäure gewaschen war, da sonst Magnesium- und evtl. Erdalkalisalze beim Behandeln mit der sauren Hydrolysenlösung entstanden wären und die Zuckerlösung verunreinigt hätten, bzw. durch Komplexbildung die spätere chromatographische Trennung unmöglich gemacht hätten. Die klare, saure Lösung schüttelten wir nun mit ca. 80 mg Silberoxyd, filtrierten nach einer halben Stunde von den festen Bestandteilen ab und engten diese Lösung, die mittlerweile durch die verschiedenen Waschwässer auf 2,5 ml vermehrt worden war, mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers bis zur Trockene ein. Der Rückstand wurde in 1 Tropfen Wasser aufgenommen und diese Lösung für chromatographische Zwecke verwendet.

Partielle Hydrolyse mit 10%iger Essigsäure

G. ZEMPLEN und A. GERECS⁶⁷⁾ gelang es, durch Hydrolyse mit 10%iger Essigsäure die Rutinose als unversehrtes Disaccharid aus Rutin abzuspalten. Die Anwendung dieser Methode gestattete uns, das Disaccharid aus unserem Carmenosid abzuspalten.

67) G. ZEMPLEN u. A. GERECS, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 2520 (1938)

Wir lösten 1 mg Substanz in 1 ml 10%iger Essigsäure und verfuhrten dann weiter wie oben beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß nach Beendigung des Erhitzens mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt werden mußte und daß das Ausschütteln mit Silberoxyd unterlassen wurde.

Papierchromatographischer Vergleich

Die nach Totalhydrolyse gewonnenen Zucker verhielten sich papierchromatographisch wie die Testsubstanzen. Wir entwickelten im System PÄW (siehe S. 40, Ia, 6) in absteigender Methode.

Der Vergleich mit authentischen Zuckern zeigte, daß die Zuckeranteile der Quercetinglykoside aus den Blättern von *Solanum tuberosum* nur von Glukose und Rhamnose gestellt werden.

T a b e l l e 9

Substanz	R _F -Wert in PÄW
Glukose	0,48
Zuckeranteil von Carmenosid	0,48
" " Quercetinoligosaccharid	0,48
" " Rutin, isoliert	0,48
Rhamnose	0,63
Zuckeranteil von Rutin, isoliert	0,63
" " Quercetinoligosaccharid	0,63

Im Falle des Carmenosids verglichen wir das nach partieller Hydrolyse abgespaltene Disaccharid im System sek.BEW (siehe S. 40, Ia, 7).

Wir entwickelten die Durchlaufchromatogramme während einer Laufzeit von 120 Std. Um ungleichmäßiges Abtropfen des Lösungsmittels zu vermeiden, versahen wir das Chromatogramm an einer Schmalseite mit 1 cm breiten und 1,5 cm langen Träufelspitzen.

Vergleich durch Papierelektrophorese

Unsere papierelektrophoretischen Untersuchungen führten wir in der Elektrophoresekammer nach W. Grassmann und K. Hannig

durch (Elphor-Gerät der Firma Bender u. Hobein, München). Die Substanzen wurden in der Mitte von 30 cm langen und 4 cm breiten Streifen aus Filtrierpapier (Nr. 2043 Mgl. der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel) mittels einer Standardgraph-Trichterfeder F Nr. 52 als dünner Strich aufgetragen. Darauf trankten wir die Streifen mit der Pufferlösung jeweils vom Rand her bis 3 mm vor die Auftragstelle, trockneten zwischen Filtrierpapier ab und befeuchteten die freigelassene Zone in der Mitte durch kurzes Pressen zwischen Filtrierpapier, das noch feucht von der Pufferlösung war.

Als Pufferlösung diente uns eine Lösung von 15,6 g Borsäure, 14,2 g Borax und 3,67 g Natriumchlorid in 2 l Wasser. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Potentiometers mit 10%iger Natronlauge auf p_H 8,25 gebracht.

Wir entwickelten während einer Dauer von 12 - 14 Std. bei 110 V.

a) Rutin

Wir unterzogen je 2 mg authentisches und isoliertes Rutin einer Totalhydrolyse und einer partiellen Hydrolyse.

Die nach dem Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung sichtbar gewordenen Flecke zeigten in beiden Fällen gleiche Laufrichtung zur Anode und gleiche Entfernung vom Startpunkt.

Rutinose :	2,3 cm
Glukose :	6,2 cm
Rhamnose :	0,8 cm

b) Carmenosid

Bei gleichem Vorgehen wie unter a) beschrieben, erhielten wir nach der Totalhydrolyse nur den der Glukose entsprechenden Fleck.

Die partielle Hydrolyse lieferte einen Zucker, der als S o p h o r o s e identifiziert werden konnte.

Zum Vergleich sind in folgender Tabelle die Entfernungen von der Stelle des Auftrags bis zu dem Punkt der

stärksten Konzentration innerhalb der Flecken in Richtung Anode gegeben:

T a b e l l e 10

Gentiobiose:	4,2 cm	Cellobiose:	-2,0 cm
Laminaribiose:	3,8 cm	Sophorose:	-1,5 cm
Maltose:	-0,6 cm	Carmenosid-	
		Zucker:	-1,4 cm

Auf Seite 15 sind die Elektrophoresestreifen photographisch wiedergegeben.

Die Möglichkeit, daß oben angegebene Werte variieren könnten und somit keinen zwingenden Schluß auf die tatsächliche Natur des fraglichen Disaccharids zuließen, haben wir durch die Verglykosidierung der unter Umständen noch zur Debatte stehenden Disaccharide mit Quercetin ausgeschaltet.

X. Klärung der glykosidischen Bindungsform

Wir trugen alle, im Verlauf dieser Arbeit genannten, Flavonolglykoside auf Filtrierpapier auf, tränkten mit einem Kaltmazerat aus Süßmandelemulsin und bewahrten das Papier in einer feuchtigkeitsgesättigten, gut abgedichteten Petrischale 24 Stunden auf. Nach dieser Zeit hatten alle Flecken, deren Farbe unter dem UV-Licht ursprünglich graubraun war, die gelbe Farbe des Aglykons Quercetin angenommen.

α -glykosidisch gebundene Testsubstanzen standen uns für Kontrollzwecke nicht zur Verfügung, da derartige Körper, bis auf einige wenige Ausnahmen in der Reihe der herzwirksamen Glykoside, in der Natur noch nicht gefunden werden konnten.

Methodische Einzelheiten zu Teil B

I. Fällung des Durethans BK 31 F

Das Ausgangsmaterial (Durethan BK 31 F), das uns zur Verfügung stand, war ein milchigweißes, für die industrielle Veredlung bestimmtes Halbfertigprodukt in Form kleiner Zylinder von 3 mm Durchmesser und 3 mm Höhe. Von diesem Stoff erhitzen wir 150 g ca. 6 Std. auf dem siedenden Wasserbad in 500 ml technischer Salzsäure (35% HCl) bis zur Lösung. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur fügten wir 750-800 ml Methanol unter leichtem Umrühren hinzu und ließen wiederum auf etwa 20° C abkühlen. Die eigentliche Fällung erfolgte nun durch Verdünnen mit Wasser, das in dünnem Strahl in das vorher geeichte Gefäß eingeleitet wird. Es muß dabei ständig gerührt werden, entweder von Hand oder mit einem geeigneten Rührwerk, um lokale Teilfällungen zu verhindern. Bei Beginn einer Trübung muß der Wasserzusatz besonders vorsichtig erfolgen (ca. 300 ml Wasser/Min.), wobei darauf zu achten ist, daß niemals verdünnt wird, ohne daß bereits vorher mit dem Rühren begonnen worden ist. Nach Beendigung der Fällung füllt man mit Wasser auf 4 l auf und läßt die Suspension etwas absitzen.

Bei dieser Arbeitsweise treten unkontrollierbare Änderungen der Salzsäurekonzentration ein. Da das Verhältnis Salzsäure Methanol jedoch ausschlaggebend für die zu erwartende Korngröße des Durethans ist, empfiehlt sich folgende Abwandlung des Verfahrens:

Man versetzt die salzsaure Polyamidlösung zunächst nur mit 400 ml Methanol, fällt und suspendiert nach dem Absaugen den Nutschenrückstand in 800 ml Methanol. Beim Versetzen mit 500 ml techn. Salzsäure geht das Durethan schlagartig in Lösung. Die erneute Fällung wird nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wie oben beschrieben vorgenommen.

Die auf diese Weise hergestellte Suspension befreien wir auf der Filternutsche, die für den genannten Ansatz mindestens einen Durchmesser von 12 cm haben sollte, von der Salzsäure und

wuschen mit 2 1/2 l Leitungswasser und anschließend mit 1 l destilliertem Wasser nach. Beim Waschen ist darauf zu achten, daß der Rückstand niemals trocken wird, so daß Risse auftreten, und daß die Masse erst ganz zum Schluß festgedrückt werden darf. Wir brachten das Material nun in eine Glasflasche und stellten uns mit destilliertem Wasser eine dickflüssige Suspension her (= Suspension I).

Ebenso ist es natürlich möglich, das Durethan zu trocknen, doch empfehlen wir bei dünnschichtchromatographischen Arbeiten, nach untenstehender Vorschrift zu verfahren.

II. Dünnschichtchromatographie auf D u r e t h a n

1. Herstellung der Platten

Wir verwendeten stets Glasplatten von 12 x 20 cm Fläche. Diese silikonisierten wir mit "Siliconölemulsion BAYER H" nach der von der Firma angegebenen Vorschrift. Das Silikonisieren der Platten ist zwar nicht unbedingt erforderlich, erleichtert aber eventuelles Konservieren der fertigen Chromatogramme.

Vom zehnten Teil der Suspension I saugten wir auf einer kleineren Nutsche wiederum das Wasser scharf ab und wuschen mit 100 ml Methanol in Anteilen nach, bis keine Flüssigkeit den Nutschenhals mehr verließ. Von dem noch methanolfeuchten Rückstand suspendierten wir sofort 15 g in 45 ml Äthylacetat, das 1% Subitogen 2N enthielt (= Suspension II).

Diese Suspension II gossen wir nun durch ein feines Sieb (engmaschiges Teesieb) auf die Glasplatten, bis nach Augenmaß etwas über die Hälfte der Fläche bedeckt war. Durch geschicktes Neigen der Platte und Verteilen mit dem Finger sorgten wir dafür, daß sich eine gleichmäßige Schicht ausbilden konnte. Nach 5minütigem Trocknen auf horizontaler Unterlage waren die Platten verwendungsfähig. Wir benetzten nun die untere Schmalseite der Schicht in etwa 1/2 cm Höhe mit einer 10%igen Subitogenlösung in Äthylacetat, um ein Abbröckeln des Randes nach dem Einstellen in das Laufmittel zu verhindern.

2. Auftragen der Substanz und Entwickeln der Chromatogramme

Zum Auftragen der Substanz bewährten sich aus dünnem Schreibmaschinenpapier gefertigte, 1 cm breite Streifen, die auf den unteren Rand der Schicht gelegt wurden. Die Startpunkte entsprachen der Eichung der Papierstreifen und hatten einen Abstand von 1,6 cm bzw. einen Randabstand von 2 cm. Die Konzentration der Lösung war so bemessen, daß nicht öfters als 2mal der gleiche Punkt befeuchtet werden brauchte. Das Entwickeln der Chromatogramme geschah in gewöhnlichen, 26 cm hohen 5 l-Einmachgläsern mit plangeschliffenem Rand und einer Glasplatte als Bedeckung. Diese Gläser füllten wir mit 100 ml Laufmittel, benetzten die inneren Wände durch entsprechendes Drehen der Kammern, um eine rasche Sättigung mit Lösungsmitteldämpfen zu erreichen und stellten die Platten, mit der Rückseite an die Glaswand gelehnt, schräg ein.

3. Technik beim Besprühen der Chromatogramme

Die entwickelten, abgetrockneten Chromatogramme besprühten wir mit dem erforderlichen Reagenz, indem wir die Platten waagrecht legten und vermieden, daß zu kräftige Sprühstöße oder aus größerer Höhe herunterfallende Tropfen die empfindliche Schicht verletzen konnten. Wir achteten ferner darauf, daß nur bis zur Transparenz der Platten oder sogar etwas weniger besprüht wurde, damit die Flecke nicht verlaufen konnten.

Betrachtet man den Zeitaufwand für die einzelnen Arbeitsabschnitte, so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Auflösen der Substanz bis zur fertigen Suspension I: 6-7 Std.

Bereitung der Suspension II: 20 Min.

Bereitung der Platten bis zum fertigen Chromatogramm: etwa
1 Std.

Zu bemerken ist außerdem noch, daß am vorteilhaftesten die Suspension I oder die fertigen Platten vorrätig gehalten werden. Eine Aufbewahrung der Suspension II ist nicht zu empfehlen, da Polyamide in Äthylacetat leicht vergilben. Dies hat auf die Trennfähigkeit allerdings keinen Einfluß.

III. Konservierung von Dünnschichtchromatogrammen

Ein Nachteil der Chromatographie auf Dünnschichtplatten war bisher stets die Tatsache, daß es nicht möglich war, die empfindlichen Beläge für längere Zeit ohne die Gefahr einer Beschädigung aufzubewahren, wobei zugleich auch eine erhebliche Anzahl von Glasplatten blockiert werden mußte. Es wurden zwar eine Reihe von Verfahren beschrieben, die auf verschiedene Weise die chromatographischen Ergebnisse einer späteren Auswertung zugänglich machten, jedoch die Verhältnisse am Original nur unvollständig wiedergaben oder mit erheblichen Kosten (z. B. Farbphotographie) verbunden waren.

Aus diesen Gründen entwickelten wir folgende Methode: Die fertigen, besprühten Chromatogramme nahmen wir in eine klare Folie aus Subitogen 2N auf, die dieser Kunststoff nach dem Aufgießen beim Erhärten an der Luft bildet.

Wir lösten das Subitogen entweder im Verhältnis 2:3 in Äthylacetat für Kunststoffplatten, oder 6 Teile Subitogen 2N in einer Mischung aus 4 Teilen Aceton und 12 Teilen Äthylacetat, der 0,5 Teile Wasser zugesetzt waren, zum Abziehen von Kieselgel-G-Platten.

Das Aufgießen geschah folgendermaßen: Wir erhöhten die Platten, die auf einer waagerechten Unterlage lagen an der unteren Schmalseite um 1 cm durch Unterlegen und gossen hier die Subitogenlösung aus 2 cm Höhe auf. Das Aufgießen setzten wir, immer knapp hinter der Front der Lösung bleibend, fort, bis diese die gegenüberliegende Kante erreicht hatte, Darauf legten wir die Platte wieder horizontal und saugten überschüssige Subitogenlösung von der zuletzt benetzten Schmalseite der Platte durch Anlegen eines zigarrendicken Wattestranges in Chromatogrammbreite ab. Nach 1/2- bis 1stündigem Trocknen an der Luft ließen sich die Chromatogramme mühelos von den silikonisierten Glasplatten abziehen, nachdem die Schicht ungefähr 1 cm vom Rand entfernt mit einem Messer geritzt worden war und auf diese Weise von überstehenden Rändern befreit werden konnte.

Sollten sich die Chromatogramme nur schwer oder unter Gefahr des Einreißen vom Glas lösen - dies kann bei Verwendung schlecht silikonisierter Platten möglich sein - dann empfiehlt es sich, das Abziehen in heißem Dampf vorzunehmen. Die Schicht läßt sich dann ohne Gefahr der Beschädigung entfernen. Bei Silicagel war es manchmal nötig, die Platten nach dem Antrocknen des Subitogens durch mehrstündiges Stehenlassen in lauwarmem Wasser, dem ein Netzer (z.B. Rei oder Pril) zugesetzt war, von der Schicht zu befreien.

Im letzten Fall erwies sich ebenfalls eine Silikonisierung als vorteilhaft, doch ist es dann nötig, die Anschlammung des Kieselgels nicht mit reinem Wasser sondern mit 50%igem Methanol vorzunehmen, da dieses eine höhere Benetzbarkeit für die vorbehandelten Glasplatten aufweist. Zu diesem Zweck schlammten wir 10 g Kieselgel G MERCK mit 20 g oben genannten Lösungsmittels an und verfuhr dann weiter nach der von E. Stahl angegebenen Methode des Auftragens mit Hilfe eines Streichers⁶⁸⁾. Nach viertelstündigem Liegen an der Luft trockneten wir noch eine halbe Stunde im Trockenschrank bei 110° C. Jetzt konnte chromatographiert und nach dem Besprühen eine Konservierung in beschriebener Weise vorgenommen werden.

IV. Umfällung von Ultramid BMK 228 zum Zweck der Bereitung eines monomerenarmen Pulvers

Das Ultramidpulver des Handels (Siebgröße 0,2 mm) fällten wir auf ähnliche Weise um, wie dies in Abschnitt I (S. 60) für das Durethan beschrieben ist.

Der Suspension von 150 g Ultramidpulver in 200 g technischen Methanol fügten wir 200 ml 25%ige Salzsäure zu, wobei augenblicklich Lösung eintrat. Nun fällten wir unter Umrühren mit Wasser, das wir sehr langsam zulaufen ließen und kamen so zu einem grobflockigen Produkt, das nach dem Waschen auf der

68) E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)

Nutsche erneut auf die angegebene Weise gelöst und gefällt wurde. Den Vorgang wiederholten wir dreimal. Vor der vierten Fällung stellten wir uns eine Lösung in 200 ml HCl und 800 ml Methanol her, kühlten auf unter 10°C ab und setzten anschließend wiederum das Wasser unter ständigem Rühren und sehr vorsichtig bis zur vollständigen Ausflockung zu. Dieses Material verwandten wir nach dem Neutralwaschen sofort für säulenchromatographische Zwecke, ohne vorher zu trocknen.

UV-spektrophotometrische Messungen eines methanolischen Auszugs der scharf getrockneten Substanz bei $230\text{ m}\mu$ ⁶⁹⁾ zeigten, daß das Ultramid praktisch frei von methanollöslichen Anteilen war. Der gleiche Effekt wäre allerdings auch durch intensives Waschen des nicht vorbehandelten Pulvers mit Methylalkohol zu erreichen gewesen, doch erhielten wir nach unserem Verfahren zugleich eine Oberflächenvergrößerung des Ultramids durch seine feinflockige Beschaffenheit, die im Gegensatz steht zu der mehr körnigen Konsistenz der Handelsprodukte, welche durch Mahlen von gröberen Brocken erhalten werden.

Zur Umfällung dieses Ultramidpulvers ist allerdings zu bemerken, daß - auch bei genauem Einhalten der Mengenverhältnisse - nicht immer reproduzierbare Ergebnisse in Bezug auf den Feinheitsgrad des gefällten Produkts erhalten werden. Die hierfür verantwortlichen Einflüsse (Größe und Umdrehungszahl des Rührers, Zuflußgeschwindigkeit des Wassers usw.) konnten noch nicht genau festgestellt werden. Es ist infolgedessen zu empfehlen, auch für säulenchromatographische Zwecke härtere Polyamidsorten, die gut reproduzierbare Korngrößen liefern, zu verwenden.

V. Dünnschichtchromatographie von Zuckern auf Silicagel

Diese Methode entwickelten wir hauptsächlich, um Zucker aus der sauren Hydrolysenflüssigkeit direkt chromatographieren zu können.

Wir trugen auf der Schmalseite der mit Kieselgel G MERCK bestrichenen Platten im Abstand von 1,5 cm 50 - 100 γ
69) O. FÖCKING, Dissertation, München (in Vorbereitung)

Zucker in Lösung mittels Schmelzpunktkapillaren auf. Nach dem Trocknen der Startflecke, entweder an der Luft oder im Trockenschrank bei 105°C , stellten wir die Platten in die Kammern schräg ein. Unser Fließmittel hatte folgende Zusammensetzung:

n-Butanol	70	Vol.
Eisessig	30	Vol.
Wasser	5	Vol.

Nachdem dieses Fließmittel das vorher markierte Ende der Laufstrecke erreicht hatte - für Zucker erwies sich eine 15 - 16 cm lange Trennstrecke als günstig - , nahmen wir die Platte heraus und trockneten bei 110°C . Wir besprühten das noch heiße Chromatogramm mit dem Reagenz nach S. M. PARTRIDGE⁷⁰⁾ und trockneten anschließend nochmals 10 Min. im Trockenschrank bei 110°C .

VI. Aufsteigende Chromatographie an Polyamidsäulen

Das Verfahren sei an dieser Stelle nur kurz beschrieben, da wir es nur noch in beschränktem Umfang anwenden konnten. Wir fertigten uns 25 cm lange Röhren von 2 cm Durchmesser aus Polyäthylenoxyd mit durchlöcherter Boden - noch besser eigneten sich allerdings käufliche, n a h t l o s e Isolierschläuche - und bedeckten den inneren Boden mit Filterpapier. Das Einfüllen des Materials ging in der Weise vor sich, daß zuerst eine 2 cm hohe Schicht aus Polyamidpulver am Boden der Röhre geschaffen wurde, diese überschichteten wir mit dem substanzgetränkten Trägermaterial, welches durch Befeuchten von Durethan mit dem zu trennenden Extrakt und durch anschließendes Trocknen erhalten werden konnte. Beim Einfüllen der Substanz achteten wir darauf, daß die Wände des Schlauches nicht bestäubt wurden und bedienten und deshalb einer Glasröhre, die wir knapp über der Oberfläche des Bodenkörpers entleerten. Nach gleichmäßigem Verteilen be-

70) S. M. PARTRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)

schickten wir weiter mit unserem Adsorbens bis 30 cm unterhalb des oberen Säulenrandes. Zu erwähnen ist noch, daß nach je 3 cm neuer Füllhöhe die Masse etwas angedrückt werden mußte. Außerdem ist es wichtig, daß die Kapazität der Säule nicht überschritten werden darf.

Die Lage der substanzhaltigen Zonen entdeckten wir bei Betrachtung im UV-Licht. Wir schnitten die Säule nun mit einer Rasierklinge in Längsrichtung auf und teilten den Säuleninhalt mit einem Messer in die gewünschten Abschnitte. Diese wurden getrocknet und anschließend auf einer G3-Glasfritte mit Methanol eluiert.

Es gelang uns mit dieser Methode, das Quercetinoligosaccharid in einem Arbeitsgang aus dem wäßrigen Extrakt von Kartoffelblättern immerhin so rein zu isolieren, daß eine UV-spektrophotometrische Bestimmung möglich war.

L e b e n s l a u f

Am 12. November 1932 wurde ich, Karl-Heinz Rösler, als Sohn des Großhandelsdrogisten Karl Georg Rösler und seiner Ehefrau Marga, geb. Hinrichs, in München geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule absolvierte ich die Oberrealschule und zwar vom 1. September 1943 bis Ende April 1945 in Wien und vom Dezember 1945 bis 17. Juli 1951 in Bad Tölz.

Am 1. Oktober 1951 trat ich in die St. Ursula-Apotheke in München als Apothekerpraktikant ein und legte am 24. September 1953 das pharmazeutische Vorexamen in München ab. Am 1. November des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Universität München und bestand hier das pharmazeutische Staatsexamen am 22. November 1956.

Vom 1. Januar bis zum 31. Mai 1957 arbeitete ich in der Viktoria-Apotheke in München als Kandidat der Pharmazie.

Seit dem 1. Juni 1957 bin ich als Doktorand am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer tätig. Vom 1. August 1958 bis einschließlich August 1959 war ich als wissenschaftlicher Hilfsassistent tätig. Ab 1. September 1959 übernahm ich die Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an diesem Institut.

